

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

JUN 24 '64

BEGRÜNDET VON

J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPET

HERAUSGEGEBEN VON

H. L. JENSEN
LYNGBY

C. B. VAN NIEL
PACIFIC GROVE

R. NILSSON
UPPSALA

G. PIEKARSKI
BONN

E. G. PRINGSHEIM
GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE

W. H. SCHOPFER
BERN

H. TAMIYA
TOKIO

T. WIKÉN
DELFT

UND DEN SCHRIFTLEITERN

A. RIPPET-BALDES
GÖTTINGEN

R. HARDER
GÖTTINGEN

29. BAND · 2. HEFT

MIT 45 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 25. FEBRUAR 1958)



SPRINGER-VERLAG

Per. QR 1 BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Ar 25

1958

Archiv für Mikrobiologie

Zeitschrift für die Erforschung der pflanzlichen Mikroorganismen. Begründet 1930
von J. Behrens, F. Boas, A. Rippel. Berlin, Springer

Das „Archiv für Mikrobiologie“ steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96,—.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20,— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30,— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40,— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotos u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

- Prof. Dr. H. L. Jensen, Lyngby/Dänemark, Statens Planteavls-Laboratorium, Bakteriologisk Afdeling,
Prof. Dr. C. B. van Niel, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station,
Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbruks högskolan, Mikrobiologiska Institutionen,
Prof. Dr. G. Pierkarski, Bonn/Rh., Venusberg, Hygienisches Institut, medizinisch-parasitologische Abteilung, der Universität,
Prof. Dr. E. G. Pringsheim, Göttingen, Untere Karspüle, Pflanzenphysiologisches Institut,
Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,
Prof. Dr. H. Tamiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokugawa Institute for Biological Research,
Prof. Dr. T. Wikén, Delft/Holland, Nieuwe Laan 5, Laboratorium voor Microbiologie, Technische Hogeschool
oder an die

Schriftleitung:

- Prof. Dr. A. Rippel-Balde, Göttingen, Institut für Mikrobiologie, Goßlerstr. 16
Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Untere Karspüle 2

Springer-Verlag

Berlin · Göttingen · Heidelberg

29. Band

Inhaltsverzeichnis

2. Heft

Seite

SIEVERS, E., Zur Ökologie und Morphologie der endotrophen phycomycetoiden Mycorrhizen. Mit 3 Textabbildungen	101
MELLANDER, O., P. E. NILSSON and L. STRID, Amino-acid Content of Leguminous Proteins as Affected by Genetic and Nutritional Factors. II	108
PEUSS, H., Untersuchungen zur Ökologie und Bedeutung der Tabakmyorrhiza. Mit 22 Textabbildungen	112
BARDAROV, S., Untersuchungen über die Biosynthese der Penicillinase. Mit 5 Textabbildungen	143
MARTIN, P., Einfluß der Kulturfiltrate von Mikroorganismen auf die Abgabe von Scopoletin aus den Keimwurzeln des Hafer (Avena sativa L.)	154
CLAUS, D., H. WITTMANN und A. RIPPEL-BALDES, Untersuchungen über die Zusammensetzung von Bakterienschleimen und deren Lösungsvermögen gegenüber schwerlöslichen anorganischen Verbindungen	169
GEITLER, L., Lamelläre Struktur des Chromatoplasten von Cyanophyceen in mikroskopischen Dimensionen und Baueigentümlichkeiten des Protoplasten von Chroococcus turgidus. Mit 4 Textabbildungen	179
CLAYTON, R. K., On the Interplay of Environmental Factors Affecting Taxis and Motility in Rhodospirillum rubrum. With 11 Figures in the text	189

(Aus der Lehr- u. Forschungsanstalt für Wein-, Obst- u. Gartenbau, Geisenheim)

Zur Ökologie und Morphologie der endotrophen phycomycetoiden Mycorrhizen

Von
E. SIEVERS

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. September 1957)

Wegen der überaus weiten Verbreitung der endotrophen phycomycetoiden Mycorrhizen im Pflanzenreich ist die Ökologie dieser Mycorrhizen von besonderem Interesse, da sie vielleicht auch einige Aufschlüsse über ihre physiologische Bedeutung — um die es ja vor allem geht — geben kann.

Schon früher hatten wir die Vermutung ausgesprochen, daß es sich möglicherweise bei den endotrophen phycomycetoiden Mycorrhizen mit Thamniskophagie (BURGEFF 1943) trotz unterschiedlichster Böden jeweils nur um *einen*, und zwar um ein und denselben pilzlichen Symbionten handeln kann (SIEVERS 1951, 1953). Damit waren wir der Meinung einiger Autoren (CAPELLETTI 1931; CIFERRI 1928; MALAN 1938; McLUCKIE u. BURGES 1932; PEYRONEL 1922, 1923, 1924; YOUSEF 1948) entgegengetreten, die annahmen, daß diese Mycorrhizen gleichzeitig durch zwei verschiedene Endophyten, einen *Phycomyceten* und einen *Rhizoctonia*-ähnlichen Pilz, hervorgerufen würden.

Um unsere Annahme weiter zu fundieren, wurde auch Material untersucht, welches wir 1953 in Italien sammelten, da hier Untersuchungen zu mehreren der oben zitierten Arbeiten angestellt worden waren. Dabei fanden wir stets dieselbe Art der Verpilzung, wie wir sie für die *Allium*- und *Solanaceen*-Arten beschrieben haben. Eine zweite Infektion durch einen *Rhizoctonia*-ähnlichen Pilz konnte auch hierbei in keinem Fall festgestellt werden. Vielmehr trafen wir die typischen Mycorrhizen sogar bei jungen Maispflänzchen (*Zea Mays L.*) und bei den Trichterlilien oder Kraftzwiebeln (*Pancratium maritimum L.*) an, die wir in den Dünen von Tirrenia (bei Marina di Pisa) fanden.

Es waren hier die nur oberflächlich verlaufenden und noch nicht weit ausgebreiteten Wurzeln des Maises, der sich durch Zufall in den Dünen angesiedelt hatte, unter ganz extremen Bedingungen infiziert. Denn die Oberfläche des Sandes hatte tagsüber (im August) eine Temperatur von etwa 50° C und darüber und war daher auch äußerst trocken.

Die Pancratien, welche gerade in der Blüte standen, wurzelten dagegen sehr tief, etwa 60—80 cm, so daß hier für die Pilze relativ etwas günstigere Bedingungen herrschten, die aber im Verhältnis zu einem „normalen“ Boden auch noch als abnorm bezeichnet werden müssen.

Die Verpilzung dieser im Dünensand wachsenden Pflanzen ist deshalb so interessant, weil damit zum erstenmal am natürlichen, jedoch mikroklimatisch ganz extremen Standort, also in einem heißen, trockenen und praktisch humusfreien Sand Mycorrhizen gefunden wurden, zu deren Bildung man doch eine gewisse Feuchtigkeit und früher (FRANCK 1891, HOWARD 1948, PEYRONEL 1940, SCHLICHT 1889, STAHL 1900) humusreichen Boden für notwendig hielt.

Daß die Mycorrhizabildung nicht von der Anwesenheit von Humus abhängig ist, haben schon unsere früheren Syntheseversuche in Quarzsand gezeigt (SIEVERS 1951). Jedoch muß die Infektion der Wirtspflanzenwurzeln durch den Symbionten noch von einigen unbekannten Faktoren abhängig sein, wie aus den Ergebnissen der Infektionsversuche zu schließen ist, die in Tab. 1 dargestellt sind.

Tabelle 1. Stärke der Wurzelverpilzung bei 6 Wochen alten Porreepflanzen
durch steigende Gaben verschiedener Böden zu reinem Quarzsand

Boden Anteil	lehmiger Sand	sandiger Lehm	Topferde (Mischung)	Buchenlauberde	Moorboden	Heideboden	Kiefern- humus
0	—	—	—	—	—	—	—
1	++	+	—	—	+	(+)	++
2	—(P)	+	(+)	—	+	+	++
5	++	++	++	—	+	++	++
10	++	++	++	—	+	++	+++
20	++	++	+++	—	++	++	+++
30	++	+++	+++	—	++	++	+++
50	++	++	+++	—	+++	+++	+++
100	++	++	+++	+	+++	+++	++

Zeichenerklärung: + bis +++ schwache bis starke Verpilzung; (+) nur sehr schwache Infektion im Anfangsstadium; (P) parasitische Infektion.

Durch jede verwendete Bodenart ließen sich Mycorrhizabildungen erreichen. Wenn die Unterschiede zwischen den einzelnen Bodenarten bzw. -typen in bezug auf den Grad der erreichten Verpilzung nicht sehr groß sind, so fällt doch der Versuch mit den steigenden Buchenlauberde-Gaben auf, bei dem nur in reiner Buchenlauberde eine geringe Verpilzung nachzuweisen war.

Auf eine andere Feststellung muß hier noch eingegangen werden. Bei dem Versuch mit dem lehmigen Sand war bei der 2%igen Gabe keine Mycorrhizabildung zu beobachten. Dagegen waren die Wurzeln der jungen Porreepflanzen von einem Parasiten (*Fusarium*) befallen. Danach

hat es also den Anschein, was auch aus zwei anderen Versuchen hervorgehen scheint, als ob einzelne Wurzelparasiten eine Infektion des Mycorrhizapilzes verhindern könnten. Umgekehrt dürfte hieraus jedoch nicht gefolgert werden, daß die Mycorrhiza in der Lage sei, parasitischen Infektionen standzuhalten, was HOWARD (1948) angibt.

Da wir damit bisher noch keine Bodenart und keinen Bodentyp angetroffen haben, in denen diese Mycorrhizen fehlten, ist anzunehmen, daß ihr Endophyt ein ganz spezifischer und obligater Wurzelsymbiont ist, der nicht auf einzelne Wirtspflanzen spezialisiert ist, sondern einen großen Kreis von Pflanzen verschiedenster Familien zu infizieren vermag. Er ist daher auch nicht an bestimmte Bodenarten oder -typen gebunden; er ist befähigt, sich längere Zeit ohne Wirtspflanze im Boden zu halten, wird aber durch diese angereichert.

Zu der Meinung vom Vorhandensein nur eines Endophyten in diesen Mycorrhizen veranlassen uns außer den schon früher mitgeteilten Beobachtungen folgende Feststellungen: a) der ganz charakteristische Habitus dieses pilzlichen Symbionten außerhalb und innerhalb der verschiedenen Wirtspflanzenwurzeln und b) das weitgehende Übereinstimmen der Morphologie der Mycorrhizen bei den *Gramineen*, *Liliaceen*, *Iridaceen*, *Amaryllidaceen*, *Solanaceen*, *Papilionaceen* u. a.

Bei einigermaßen vorsichtigem Präparieren feiner Wurzeln stößt man nicht allzu selten auf das typische Außenmycel mit seinen Eintrittsstellen, wie es Abb. 1 hier von Porree und 13 von *Physalis* (SIEVERS 1953) sowie 14 von der Kartoffel (SIEVERS 1951) zeigen: Während die „Laufhyphen“ dieses Pilzes — auch wenn sie sich gabeln (echte Verzweigung) — nie Querwände besitzen, sind letztere an den Seitenhyphen meist sogar in recht kurzen Abständen zu finden, die an einem nasenartigen Vorsprung einer Hyphe „höherer Ordnung“ entspringen, wo also keine echte Verzweigung vorliegt.

Diese Art der Abzweigung septierter Hyphen mit stets kleineren Durchmessern als die Hyphen „höherer Ordnung“ ist charakteristisch für diesen Endophyten, für dessen Innenmycel diese Beobachtung in gleicher Weise gilt. Daher finden sich auch innerhalb der Wurzel morphologisch so verschiedene Hyphen wie breite, knorrige, unseptierte und

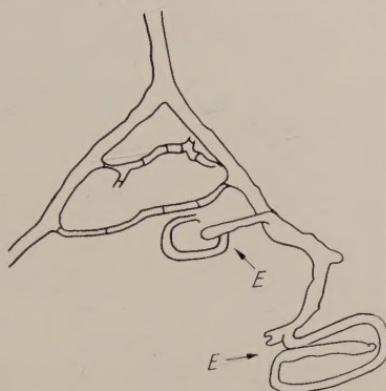


Abb. 1. Außenmycel des Mycorrhizapilzes mit septierten Anastomosen von einer Porreewurzel. Wegen der im Mikroskop tiefenmäßig weit auseinander liegenden Myzelteile konnte keine Mikraufnahme gemacht werden.
Bei „E“ 2 typische Eintrittsstellen in den ersten Wurzelzellen. Etwa 300:1

schmale, geradwandige, septierte (siehe Abb. 2a u. b). Diese Tatsache wird wohl die oben zitierten Autoren zu der Annahme verleitet haben, diese Mycorrhizen würden durch zwei verschiedene Pilze verursacht.



Abb. 2. Aufnahme eines Quetschpräparates einer Porreewurzel mit typischem Innenmyzel des Endophyten. a und b bei verschiedener Tiefeneinstellung des Objektivs.
Beschreibung im Text; etwa 400:1

Die Abb. 2a u. b zeigen Aufnahmen von einem Quetschpräparat einer Porreewurzel bei verschiedener Tiefeneinstellung. Auf der Abb. 2a kann man bei den Pfeilen „1“ und „2“ den Verlauf einer stärkeren querwandlosen Hyphe beobachten. Bei dem Pfeil „3“ erkennt man einen Vorsprung, von dem in der oben beschriebenen Weise eine Seitenhyphe ausgeht. Letztere besitzt in ziemlich regelmäßigen Abständen Querwände, auf die durch die Pfeile „4“ hingewiesen wird. Genau ließen sich

diese Septen bei etwas tiefer eingestelltem Objektiv — hierzu Abb. 2 b — feststellen. Die Numerierung der Pfeile erfolgte auch hier wie in der für die Abb. 2 a angegebenen Weise.

Die lange umstrittene Frage nach der Bedeutung der Vesikel dieses Pilzes glauben wir, wie schon PEYRONEL (1924) vermutete, dahingehend beantworten zu können, daß diese Gebilde sich unter bestimmten Voraussetzungen zu Sporangien entwickeln.

Im Sommer 1953 konnten mehrfach und vor allem in Wurzeln von Porree (*Allium porrum* L.) Vesikel angetroffen werden, deren granulierter Inhalt zu vielen rundlichen Klumpen oder schon zu mit einer Membran umgebenen, sporen-ähnlichen Kugelchen geformt war, wie es Abb. 3 erkennen läßt.

Da in den Jahren zuvor nie-
mals eine solche Entwicklung innerhalb der Vesikel beob-
achtet werden konnte, wird
angenommen, daß vor allem Klimafaktoren hierbei von Be-
deutung sind, zumal auch Ge-
wächshausversuche gezeigt haben, daß bestimmte Klimafaktoren die Mycorrhizabildung fördern oder hemmen können.

Nach allen bisherigen Befunden erscheint nun die Annahme gerechtfertigt, daß es sich bei den bisher von uns untersuchten endotrophen, phycomycetoiden Mycorrhizen mit Thamniskophagie um ein und denselben Pilz handelt (vgl. COSTANTIN et MAGROU 1935; JONES 1924; MAGROU, DOUCHEZ et SEGRETAIN 1943; WINTER 1950).

Es tritt hier nun die Frage auf, ob endotrophe, phycomycetoiden Mycorrhizen mit Tolypophagie, welche bis auf die Pilzknäuel (die an Stelle der Arbuskel gebildet werden) sehr den verbreiterteren thamnisko- phagen Mycorrhizen ähneln, auch durch denselben Endophyten entstehen können. Das heißt also, ob der Einfluß der Wirtspflanze auf ihren Symbionten so stark sein kann, um ihn zu derartig anderen Gebilden zu veranlassen.

Über diese Frage kann natürlich nur ein Syntheseversuch mit dem aus den Wurzeln isolierten Pilz und thamnisko- und tolypophagen Wirtspflanzen Aufschluß geben. Da dieser Endophyt aber bisher nicht

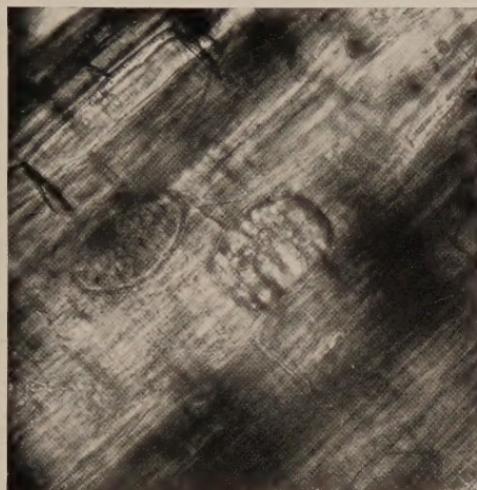


Abb. 3. Quetschpräparat von einer Porree-Mycorrhiza mit einigen Vesikeln. Der linke, aber noch mehr der etwas größere, mittlere weist eine deutliche sporen-ähnliche Struktur seines Inhalts mit beginnender Membranbildung auf. Etwa 200:1

isoliert und in Reinkultur gezogen werden konnte (vgl. SIEVERS 1951), können vorläufig hierüber auch nur Mutmaßungen angestellt werden.

In diesem Zusammenhang kann aber nicht unerwähnt bleiben, daß z. B. die Gestalt und Struktur der Vesikel in den tolypophagen Mycorrhizen der Weinreben (*Vitis vinifera* L.), die von RIVES (1923) schon beschrieben wurden, eine andere ist als die derjenigen Vesikel, die sich in den Wurzeln der thamniskophagen Wirtspflanzen finden. Man könnte daher hier vermuten, daß die tolypophagen Mycorrhizen durch einen anderen Pilz als die thamniskophagen verursacht würden. Die Ähnlichkeit beider Pilze und ihre Art des Eindringens in die Wirtswurzeln sowie die Art ihrer Verbreitung innerhalb der Wurzeln sprechen aber gegen eine solche Annahme. Und eigene Übertragungsversuche von tolypophagen Wirtspflanzen auf thamniskophage und umgekehrt (siehe Tab. 2) deuten darauf hin, daß es sich bei manchen dieser beiden phycomycetoiden Mycorrhizatypen um die gleichen Mycelien handeln könnte.

Tabelle 2. Versuche zur Übertragung des Mycorrhizapilzes in reinem Quarzsand

Fangpflanzen (thamniskophag)	Zwiebel (<i>All. cepa</i> L.)	Weizen (<i>Triticum</i> L.)	Hafer (<i>Avena sat.</i> L.)	Wildkartoffel (<i>Sol. demiss.</i> L.)
Infektionspflanzen				
Porree (<i>All. porrum</i> L.) th. . . .	+++	+++	++	++
Herbstzeitlose (<i>Colch. autumn.</i> L.) to.	+++	+++	++	++
Immergrün (<i>Vinca minor</i> L.) to. . .	++	++	+	+
Aronstab (<i>Arum macul.</i> L.) th. . . .	++	++	+	+
Kontrolle (ohne Inf.-Pfl.).	—	—	—	—

Bemerkung: th. thamniskophage Wirtspflanze; to. tolypophage Wirtspflanze.

Beweise stellen diese Versuche jedoch nicht dar, da sie nicht — wie oben gefordert — eine unter sterilen Bedingungen erzeugte Synthese von Wirtspflanze und Endophyt sind, sondern unter ökologisch weitgehend natürlichen Bedingungen angestellt wurden. Die Behauptung vom Existieren typischer Wirtspflanzenkreise (WINTER u. BIRGEL 1953) ist daher vielleicht etwas gewagt, so daß derartige sterile Synthesevereuche nur als Hinweise dafür zu werten sind, daß thamnisko- wie tolypophage Wirtspflanzen gleichermaßen durch dasselbe Infektionsmaterial infiziert werden können.

In die gleiche Richtung weist vielleicht auch die Feststellung, daß alle *Liliaceen* phycomycetoide Mycorrhizen besitzen, von denen nur die der Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale* L.) tolypophagen Typs sind, so daß anzunehmen wäre, daß auch letztere durch den Endophyten der übrigen *Liliaceen* infiziert wird (vgl. Tab. 2).

Trotzdem soll hieraus noch nicht geschlossen werden, daß beide Mycorrhizatypen durch denselben Pilz verursacht werden, daß also die Wirtspflanze die Art der Mycelverdauung bestimmt und den Pilz zur

Knäuel- (daher Tolypophagie) oder zur Arbuskelbildung (daher Thamniskophagie) veranlaßt. Und wie schon betont, können erst einwandfreie Syntheseversuche endgültige Klarheit schaffen.

Literatur

- BURGEFF, H.: Naturwissenschaften **30**, 558—567 (1943). — CAPPELLETTI, C.: Ann. di Bot. **19**, 1—62 (1931). — CIFERRI, R.: Phytopath. Z. **18**, 249—261 (1928). — COSTANTIN, J., et J. MAGROU: Ann. Sci. nat. Bot., Ser. 10, **17**, 37—50 (1953). — FRANK, B.: Ber. dtsch. bot. Ges. **9**, 244—253 (1891). — HOWARD, A.: Mein landwirtschaftliches Testament. Berlin-Frankfurt: Siebeneichenverl. 1948. — JONES, F. R.: J. Agricult. Res. **29**, 459—470 (1924). — MAGROU, J., Y. DOUCHEZ et G. SEGRETAIN: Ann. Jnst. Pasteur **69**, 246—247 (1943); ref. Revue Mycol. **23**, 452 (1944). — MALAN, C. E.: Ann. di Bot. **21**, 465—494 (1938). — McLUCKIE, J., and A. BURGES: Proc. Linnean Soc. N. S. Wales **57**, 291 (1932); ref. in Revue Mycol. **12**, 311 (1933). — PEYRONEL, B.: Boll. Staz. pat. veget., Roma **3**, 43—50 (1922); ref. in Revue Mycol. **2**, 172 (1923). — Soc. mycol. de France **39**, 119—126 (1923). — Riv. Biol. Vol. V, 4, 463—485 u. VI, 1, 17—53 (1924); ref. Revue Mycol. **3**, 538—539 (1924). — Boll. Staz. pat. veget. Roma **5**, 73—75 (1924); ref. in Revue Mycol. **4**, 756 (1925). — Atti R. Accad. Sci. Torino **75**, 391—401 (1940); ref. in Biol. Abstr. **1**, 6046 (1949). — RIVES, L.: Rev. de Vitic. **59**, 385—392 u. 405—409 (1923). — SCHLICHT, A.: Beitrag z. Kenntnis der Verbreitung u. Bedeutung der Mycorrhiza. Diss. Erlangen 1889. — SIEVERS, E.: Zum Problem der Mycorrhiza bei landwirtschaftlichen Kulturpflanzen unter besonderer Berücksichtigung der Allium- und Solanum-Arten. Diss. Bonn 1951. — Arch. Mikrobiol. **18**, 289—321 (1953). — WEINBERG u. KELLER (im Druck). — STAHL, E.: Jb. Bot. **34**, H. 4 (1900). — WINTER, A. G.: Naturwissenschaften **37**, 542—543 (1950). — WINTER, A. G., u. G. BIRGEL: Naturwissenschaften **40**, 393—394 (1953). — YOUSEF, H. M.: Proc. Egypt. Acad. Sci. **2** (1948); ref. in Revue Mycol. **28**, 290 (1948).

(From the Department of Medical Biochemistry, University of Gothenburg
and the Institute of Microbiology, Uppsala 7, Sweden)

Amino-acid Content of Leguminous Proteins as Affected by Genetic and Nutritional Factors. II

By

OLOF MELLANDER, PER ERIC NILSSON and LARS STRID

(Eingegangen am 21. Oktober 1957)

In an earlier communication (P. E. NILSSON and coll., 1954) the authors gave an account of some preliminary experiments on the influence of genetic and nutritive factors upon the composition of leguminous proteins. In these experiments the amino acid composition of the proteins was studied with the help of paper chromatographic analysis of hydrolysates from the plant material after extraction of free amino acids. In the present paper an account is given of quantitative amino-acid analysis of hydrolysates from the same plant material as in the earlier communication.

That the content and composition of the individual proteins in a plant material and also their quantitative distribution in the total protein fraction occurring, may as well be a function of the conditions of cultivation as a property of the variety of plant is known. A variation in the quantitative relations of the protein components also entails a variation in the total amino-acid content in so far as the components contain different amounts of one or several amino acids. In the earlier communication referred to above, some investigations concerning the amino-acid content in a number of vegetable proteins, above all leguminous proteins, are briefly discussed. With reference to these studies brief mention may be given to some further papers throwing light upon the influence of different factors upon the protein synthesis in plants.

American investigations of the composition of the protein in different varieties of corn afford interesting examples of the way in which the total protein in a plant may be changed. The studies are based upon plant breeding work resulting in a series of corn varieties with great differences in the protein-content (WOODWORTH, LENG and JUGENHEIMER 1952). In this material MITCHELL, HAMILTON and BEADLES (1954) studied the amino-acid composition of the protein and found marked differences between the varieties. Especially pronounced was a diminishing content of tryptophan and lysin with a rising content of total protein in the plant material. This was shown to be due to the fact that with an increasing protein-content zein, which is very poor in tryptophan and lysin, increased proportionately more than other proteins. A study of vegetable proteins aiming to ascertain the quantitative relations between the different protein-fractions occurring in a plant

material thus automatically yields, in a case like this, information concerning changes in the content of certain important amino acids. This might also be applied to the study of leguminous proteins. A change in the quantitative relations of for example albumins and globulins in peas thus automatically implies a change in, *inter alia*, the content of lysin in the total protein in the material, since according to DANIELSSON and LIS (1952) the lysin-content is particularly high in the albumin of certain pea-materials.

Earlier investigations on the influences upon leguminous proteins of environmental factors and of certain characteristics of the plant itself are very few. We may adduce here an investigation by SHELDON, BLUE and ALBRECHT (1948) which throws light upon the influence of varying fertilization, especially with trace-elements, and which indicate certain differences in, *inter alia*, the amino-acid content of the lucerne proteins. They used a microbiological technique. PFENNIG (1956) has quite recently described a series of paper chromatographic analyses of amino acids in inoculated and non-inoculated peas, which shows certain differences in the free amino acids, while the proteins showed no differences worth mentioning in the amino-acid composition.

RENNER, BENTLEY and MCEBROY (1953) have carried out analyses on a series of amino acids in protein from oats cultivated in soil poor in sulphur before and after supplementary fertilization with sulphur. The treatment resulted in a marked increase of leucine, isoleucine, valine, methionine and histidine in the protein of the crop. MERTZ and MATSUMOTO (1956) found, on growing lucerne in a sand culture deficient in sulphur, a reduction in the content of protein as compared with other nitrogen-containing fractions. Asparagin and arginine were more concentrated in the water-soluble nitrogen fractions in the leaves in the sulphur deficient culture.

It has been shown by several researchers that plant material contains considerable amounts of free amino acids. Extensive studies have been carried out, especially on leguminous plants, by MIETTINEN and VIRTANEN (1953) and MIETTINEN (1955). The content of free amino acids and other soluble nitrogen compounds has been studied in other plants by, amongst others, STEWARD, ZACHARIUS and POLLARD (1955) and GROBBELAAR, POLLARD and STEWARD (1955).

It has been shown in several investigations that the quantitative relations between free amino acids and protein may vary. Strong influence is exerted by the supply of nutrients, deficiencies in a number of different mineral elements leading to an increase in the content of free amino acids in relation to the content of protein. STEINBERG (1951) has collected a large number of such observations. Quite recently DEMETRIADES (1956) has described cultivations with iron deficiency, which led to a marked increase of the free amino acids in the plant material. The nutritional importance of the free amino acids is still unknown. It is therefore essential in studies on the nutritive value of the vegetable proteins to keep clearly distinct these amino acids and those contained in the proteins.

As has already been mentioned, our investigations have for the time being been restricted to leguminous plants. The chief reason for this is the special position occupied by the leguminous crops through the synthesis of their protein on the basis of symbiotically fixed atmospheric nitrogen, a process of extreme general importance in the protein supply.

Methods and results

The following plant material was analysed; the leaves and stalks on non-inoculated and inoculated peas (Gyllen), leaves + stalks of non-inoculated and inoculated diploid red clover (Ultuna) and leaves + stalks of non-inoculated and inoculated tetraploid red clover (UO 36).

Nitrogen was supplied to the non-inoculated series in the form of nitrate. All the plant cultures were cultivated in a greenhouse and were harvested at an early stage of the flowering. (For details see NILSSON, KORSAN-BENGTSSEN and MELLANDER 1954).

Table 1. *The content of amino-acids in hydrolysate from different materials of peas and red clover*

	Peas (stalks)		Peas (leaves)		Red clover (leaves + stalks)	
	Non-inocu- lated (nitrate)	Inoculated	Non-inocu- lated (nitrate)	Inoculated	Tetraploid UO 36	Diploid Ultuna
<i>g per 100 g dry matter (alcohol- extracted)</i>						
Total nitrogen	0.74	1.4	1.8	3.8	3.4	3.6
Protein (N · 6.25)	4.6	8.7	11.2	23.8	21.2	22.5
Total amino-acids	4.1	8.2	9.6	23.1	21.6	23.3
<i>g amino-acid-N per 100 g total N:</i>						
Aspartic acid	7.9	11.7	6.6	8.0	8.5	7.9
Threonine	3.5	3.5	3.3	4.4	4.4	4.2
Serine	4.9	5.7	3.4	5.8	4.9	4.7
Glutamic acid	5.9	5.9	6.8	6.0	8.2	7.0
Proline	4.4	4.4	4.3	4.1	4.7	4.6
Glycine	6.0	6.6	6.1	6.0	6.7	7.1
Alanine	5.3	5.4	5.5	5.8	6.7	7.1
Valine	3.3	3.6	4.4	5.4	4.3	4.9
Methionine	0.5	0.4	0.5	0.7	0.7	1.0
Isoleucine	2.5	2.7	2.8	2.8	3.2	3.6
Leucine	3.8	4.1	4.7	4.9	5.5	6.2
Tyrosine	1.5	1.9	1.5	1.3	2.1	2.4
Phenylalanine	2.1	2.2	2.2	3.5	3.3	3.2
Histidine	3.7	3.5	3.2	2.8	3.4	3.6
Lysine	7.5	5.8	5.8	7.7	6.0	6.8
Arginine	11.7	9.1	8.9	9.3	10.2	10.8
NH ₃	20.0	21.5	14.5	16.2	15.9	12.6
Total amino-acid nitrogen	94.5	98.0	84.5	94.7	98.7	97.7

The air-dried plant material was ground, extracted and hydrolyzed in accordance with the procedure described in the earlier communication. Amounts of the hydrolysates corresponding to 0.3–0.5 mg N were measured off and applied on Dowex 50 columns according to MOORE and STEIN (1951). The eluate was collected in a fraction collector and fractions of 1 ml were colorimetrically measured with ninhydrin according to MOORE and STEIN (1948).

The quantitative analyses of amino acids carried out are shown in Table 1. The result agrees in the main with the results obtained with the help of paper chromatography in the previous paper in this series. They diverge, however, from the earlier observations inasmuch as the difference between tetraploid and diploid red clover in respect of the content of arginine was here not observed. This evidently is due to difficulties in identification of the arginine-spot on the paper chromatograms.

It has proved that the way in which the fresh material is collected is of great importance for the degree of enzymatic hydrolysis after harvesting. So far experiments have been carried out with reference to the breaking down of the carbohydrate moiety (MELLANDER, NILSSON and SVENNERHOLM, unpublished data).

Summary

Quantitative analyses have been carried out on air-dried plant material in respect of the amino-acid composition as a function of condition of cultivation and selection of variety. Arginine occurs in both the varieties of clover examined and not, as was earlier reported on the basis of the paper chromatographic analysis, only in the tetraploid variety.

No pronounced differences between inoculated and non-inoculated plants or between genetically different clovers were demonstrated. The total nitrogen content was higher in the inoculated plants.

This investigation is carried out with financial support from the Agricultural Research Council, the Medical Research Council and the Swedish Natural Science Research Council.

Literature

- DANIELSSON, C.-E., and H. LIS: Acta chem. Scand. (Copenh.) **6**, 139 (1952). — DEMETRIADES, S. D.: Nature (Lond.) **177**, 95 (1956). — GROBBELAAR, N., J. K. POLLARD and F. C. STEWARD: Nature (Lond.) **175**, 703 (1955). — MERTZ, E. T., and H. MATSUMOTO: Arch. of Biochem. a. Biophysics **63**, 50 (1956). — MIETTINEN, J. K., u. A. I. VIRTANEN: Physiol. Plantarum (Copenh.) **5**, 540 (1952). — MIETTINEN, J. K.: Biochemistry of Nitrogen. Helsinki **1955**, 520. — MITCHELL, H. H., T. S. HAMILTON and J. R. BEADLES: J. Nutrit. **48**, 461 (1954). — MOORE, S., and W. H. STEIN: J. of Biol. Chem. **176**, 367 (1948); **192**, 663 (1951). — NILSSON, P. E., K. KORSAN-BENGTSSEN and O. MELLANDER: Arch. Mikrobiol. **20**, 404 (1954). — PFENNIG, N.: Arch. Mikrobiol. **24**, 8 (1956). — RENNER, R., C. F. BENTLEY and L. W. McEBROY: Soil. Sci. **270** (1953). — SCHELDON, V. L., W. G. BLUE and W. A. ALBRECHT: Science (Lancaster, Pa.) **108**, 426 (1948). — STEINBERG, R. A.: Mineral Nutrition of Plants, Wisconsin. 1951. — STEWARD, F. C., R. M. ZACHARIUS and J. K. POLLARD: Biochemistry of Nitrogen. Helsinki **1955**, 321. — WOODWORTH, C. M., E. R. LENG and R. W. JUGENHEIMER: Agronomy J. **44**, 60 (1952).

(Aus der Botanischen Abteilung Madaus, Köln-Merheim)

Untersuchungen zur Ökologie und Bedeutung der Tabakmycorrhiza

Von
HELGE PEUSS

Mit 22 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. Oktober 1957)

A. Problemstellung und Literaturübersicht

Eine Verpilzung der Wurzeln mit der endotrophen Mycorrhiza tritt bei fast allen krautigen Pflanzen auf und ist auch auf Kulturböden viel verbreiter als man ursprünglich angenommen hatte:

SCHLICHT (1889) und STAHL (1900) stellten fest, daß eine große Zahl der krautigen Pflanzen eine endotrophe Verpilzung in ihren Wurzeln aufweisen. GALLAUD (1905), SAMUEL (1926), ASAI (1934) und BIRGEL (1953) erweiterten durch ihre Untersuchungen die Kenntnis über die Verbreitung dieses Mycorrhizatyps.

Nach SCHLICHT (1889) tritt die Mycorrhiza vorwiegend auf humusreichem Substrat auf, während sie auf Kulturböden stark vermindert ist. STAHL (1900) fand die Mycorrhiza vor allem auf nährstoffarmen Standorten. In Übereinstimmung damit stellte PEYRONEL (1922) auf gut gedüngten Getreidefeldern nur eine sehr schwache Verpilzung fest. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen konnten aber WINTER (1951), BIRGEL (1953) und SIEVERS (1953) zeigen, daß sowohl kultivierte Gramineen als auch viele gärtnerische Kulturpflanzen eine starke Verpilzung unabhängig vom Bodentyp aufweisen.

STAHL folgert aus seinen Beobachtungen über das ausschließliche Vorkommen der Mycorrhiza auf nährstoffarmem Substrat, daß die endotrophe Mycorrhiza die Nährsalzaufnahme begünstigen müsse. Für die ektotrophe Baummycorrhiza hat diese Auffassung STAHLS ihre Bestätigung gefunden, wie insbesondere durch Versuche mit Isotopen gezeigt werden konnte (KRAMER u. WILBUR 1949, MELIN u. NILSON 1952, HARLEY u. McCREADY 1956). Bei der phycomyctoiden endotrophen Mycorrhiza hat der Pilz jedoch eine geringere Verbindung zum umgebenden Substrat, so daß ihm als nährstoffübertragendes Organ wohl kaum Bedeutung kommt (DEMETER 1923, WINTER 1951).

GALLAUD (1905) und DEMETER (1923) sind der Ansicht, daß allein der Pilz aus dem Zusammenleben einen Nutzen zieht. Dagegen halten JANSE (1897) und McLENNAN (1926) eine mutualistische Symbiose für wahrscheinlicher; denn die Sporangienbildung wird meist als eine Verdauung des Pilzes von der Wirtspflanze gedeutet. ENDRIGKEIT (1937) untersuchte bei *Allium* mit verschiedenen Farbstoffen Permeabilität und Leitvermögen von Pilz und Pflanze. Er schließt aus der vermehrten Farbstoffaufnahme durch den Pilz und der Abgabe dieser Farbstoffe ins Cytoplasma des Wirtes, daß nur die Pflanze Nutzen aus der Wurzelverpilzung zieht. Eine günstige Beeinflussung der Pflanze durch den Pilz halten auch BUTLER (1939) und WINTER (1951) für möglich. Als Äquivalent für die entzogenen Nährstoffe

soll der Pilz der Pflanze Wuchsstoffe (BUTLER) oder Wirkstoffe unbekannter Natur (WINTER) zur Verfügung stellen, woraus ein Gleichgewicht zwischen den Partnern resultiere.

BIRGEL (1953) untersuchte bei einigen gärtnerischen Kulturpflanzen den Einfluß der Mycorrhiza auf die Pflanzenentwicklung. Er fand bei *Clematis vitalba* einen fördernden, bei *Chlorophytum comosum* einen hemmenden und bei *Colchicum autumnale* keine Auswirkung auf das Pflanzenwachstum.

Die einzelnen Autoren beurteilen also das Pilz-Wirt-Verhältnis in Form der endotrophen Mycorrhiza sehr verschieden. Das mag zum Teil darin begründet sein, daß sie mit verschiedenen Versuchsstoffen experimentierten. Man kann nämlich nicht a priori annehmen, daß sich die phycomycetoide Mycorrhiza bei allen Pflanzenarten gleichsinnig auswirkt. Andererseits können die von den genannten Autoren angewandten Methoden nicht zu eindeutigen Aussagen über die Bedeutung des Pilzes für die Wirtspflanze führen, da in keinem Falle verpilzte und unverpilzte Pflanzen unter sonst völlig identischen Bedingungen miteinander verglichen wurden.

Einen solchen Vergleich läßt wohl am ehesten die Sterilkultur zu, und man hat deshalb auch immer wieder versucht, Pilz und Pflanze unter sterilen Bedingungen aufzuziehen [BERNARD (1911), DEMETER (1923), MAGROU (1936), BOUWENS (1937), MOSTAFA (1938), LIHNELL (1938), HARRISON (1955)]. Es ist aber unwahrscheinlich, daß die isolierten, so unterschiedlichen Pilze (*Rhizoctonia*, *Mucor*, *Pythium*) innerhalb der Pflanze Arbuskeln, Vesikel und ein nur in Ausnahmefällen, und dann ganz vereinzelt, septiertes Mycel — die Kriterien der endotrophen Mycorrhiza — ausbilden. Man muß daraus folgern, daß die isolierten Pilze nicht mit dem phycomycetoiden endotrophen Mycorrhizapilz identisch sind. Es besteht ja wohl heute kaum mehr ein Zweifel darüber, daß die Pilze der endotrophen Mycorrhiza in die Klasse der *Phycomyces* und vielleicht in die Gattung der *Endogonaceae* gehören; dafür spricht die Vielkernigkeit der Hyphen, das Fehlen von Querwänden und die Ähnlichkeit der Vesikel mit Sporangien und Oogonien (BUSICH 1913, PEYRONEL 1923, 1924; JOHANNSEN 1931; BUTLER 1939; MOSSE 1953, 1956).

Dieser Annahme steht auch nicht die verschiedenartige Ausbildung der Mycorrhiza in den Wurzeln der einzelnen Wirtspflanzen entgegen. Ähnlich wie wir es von parasitischen Pilzen kennen, könnte auch hier die morphologische Struktur des Endophyten unter dem Einfluß des jeweiligen Wirtes in gewissen Grenzen wandelbar sein (GÄUMANN 1946).

PEYRONEL (1924) beschreibt als erster die endotrophe Mycorrhiza bei *Nicotiana tabacum*. KOCH (1935) und SELL (1955) konnten diese Beobachtung bestätigen.

Gültige Aussagen über das Zusammenleben von Pilz und Pflanze, insbesondere über die Wirkung des Pilzes auf den Wirt, liegen jedoch nicht vor. Die — im Vergleich zur endotrophen Orchideenmycorrhiza (BURGEFF 1938) — geringe Mycelverbindung zwischen dem Endophyten und dem Boden macht es von vornherein wenig wahrscheinlich, daß ihm als unmittelbarer Nährstoffvermittler für den Wirt (WINTER 1951) größere Bedeutung zukommt. Innerhalb der Wurzel besteht aber eine so enge Verflechtung zwischen Pilz und Wirtszellen, daß eine gegenseitige Beeinflussung wohl anzunehmen ist.

Durch eine sterile Aufzucht von Pilz und Pflanze würden sich wichtige Erkenntnisse über das Pilz-Wirt-Verhältnis gewinnen lassen, die auf keinem anderen Wege erlangt werden können. Jedoch schien die Sterilkultur nicht zur Untersuchung aller Fragen des Pilz-Wirt-Verhältnisses

geeignet, besonders nicht, wenn ökologische Faktoren berücksichtigt werden sollten. Es galt also, eine Methode zu finden, die unter natürlichen oder annähernd natürlichen Bedingungen eine vergleichbare Aufzucht mycorrhizafreier und -haltiger Pflanzen zuließ.

Voraussetzung für solche Untersuchungen war aber: 1. Die morphologische Ausbildung des Pilzes in der Wurzel und 2. den Infektionsmodus kennenzulernen; 3. zu klären, von welchen Faktoren, besonders auch edaphischer Art, die Mycorrhizabildung unter natürlichen Bedingungen abhängig ist. Erst dann konnte die Bedeutung des Pilzes für die Pflanze und damit das Pilz-Wirt-Verhältnis untersucht werden.

B. Experimenteller Teil

I. Material und allgemeine Methoden

1. Versuchspflanze und Pflanzenanzucht. Versuchspflanze war *Nicotiana tabacum var. Havanna Hochzucht*. Die Tabaksamen wurden in gedämpfte Gewächshauserde (Mischung von Torf und Kompost 1:6) — die Dampfbehandlung reichte zum Abtöten der Mycorrhizakeime aus — ausgesät, die Pflänzchen in gleiche Erde pikiert und nach 6 Wochen als Versuchspflanzen verwendet.

2. Versuchserde. Der verwendete Boden war, sofern nicht anders angegeben, ein sandiger Lehmboden. Er wurde immer vom gleichen Standort (Brachland) bis zur Tiefe von 18 cm entnommen und wird im folgenden mit der Bezeichnung „Standarderde“ geführt. Die Erde wurde im Gewächshaus zum Trocknen ausgebreitet und anschließend gesiebt.

3. Allgemeine Versuchsanordnung. Die 6 Wochen alten Versuchspflanzen wurden, wenn nicht anders vermerkt, in 17 cm Blumentöpfen (Füllgewicht 1,5 kg Erde) umgepflanzt. Für spezielle Untersuchungen wurden glasierte Kulturgefäße (System Prof. VOLK) gewählt, um den Ansprüchen, die an vergleichbare Untersuchungen geknüpft sind, besser gerecht werden zu können. Die Blumentöpfe standen auf einem Untersatz und wurden je nach Bedarf 1—3 mal täglich von unten gegossen, um ein Verschlämmen der Erde zu vermeiden. Die Versuchspflanzen standen in einem temperierten Gewächshaus mit einer Durchschnittstemperatur von 18—22° C.

4. Herstellung der Präparate. Bei Abbruch des Versuches wurden die Wurzeln sorgfältig von der Erde getrennt und unter Leitungswasser gesäubert. Von 3 verschiedenen Stellen der Wurzel wurden Handschnitte hergestellt: a) gleich unterhalb des Wurzelhalses, b) in der Mitte, c) an den Wurzelenden.

Von jeder Pflanze wurden 10—20 Präparate, je nach Größe des Wurzelsystems, gemacht; ein Präparat enthielt etwa 100 Schnitte. Die Schnitte wurden in einem Gemisch von Methylenblau (Löffler) und Glycergelatine nach Kaiser (Merck) im Verhältnis 1:4 gefärbt und konserviert.

5. Verpilzungsgrad. Der Mycorrhizabefall der Pflanzen wurde mikroskopisch ermittelt und der Verpilzungsgrad prozentual wie folgt berechnet:

$$\text{Verpilzungsgrad} = \frac{\text{Zahl myc.-haltiger Schnitte} \cdot 100}{\text{Gesamtzahl der Schnitte}}$$

Die in den Untersuchungen zu den verschiedenen Daten als Verpilzungsgrade angegebenen Werte geben jeweils die durchschnittliche Verpilzung von 3 Pflanzen an, ermittelt aus 3000—6000 Schnitten (vgl. oben).

6. Herstellung von Torf- und Fichtenstreuextrakten. 100 g trockener Torf bzw. lufttrockene Fichtenstreu wurden in 500 ml aqua bidest. 24 Std bei

Zimmertemperatur extrahiert, abgepreßt, filtriert und im Vakuum bei 38° C auf $\frac{1}{10}$ der Ausgangsmenge eingeengt. 50 ml Torf bzw. Fichtenstreuextrakt entsprechen also den kaltwasserlöslichen Substanzen von 100 g Torf bzw. Fichtenstreu.

7. pH-Werte. Der pH-Wert der Standarderde betrug 6,7; der des Torfextraktes 5,8 und der des Fichtenstreuextraktes 5,0.

II. Morphologische Beobachtungen

Notwendige Voraussetzung für alle weiteren Untersuchungen war, die Morphologie des Pilzes soweit zu studieren, daß man ihn in allen „Erscheinungsformen“ eindeutig identifizieren konnte.

1. Eindringen und erste Entwicklungsstadien

Es gibt keine besonders prädestinierten Stellen, an denen der Pilz in die Wurzel eindringt. Jede Zelle der jüngeren Wurzel kann vom Pilz befallen werden. Der Pilz kann auch auf der Oberfläche der Wurzel entlangwachsen, und nur seine Verzweigungen dringen jeweils in die Wurzel ein. Eine Infektion durch die Wurzelhaare wurde nie beobachtet. Die Hyphen dringen in die erste Zellschicht ein und verknäulen sich dort (Abb. 1). Sobald die Hyphen in die nächste

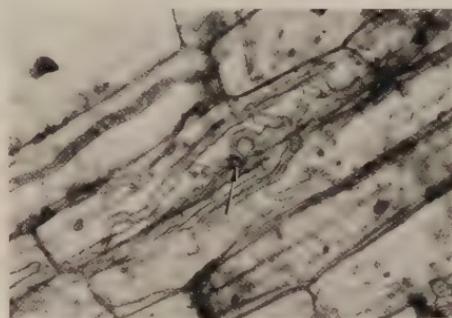


Abb. 1. Eintrittsstelle mit infizierter Epidermiszelle
(Vergr. 230 mal)



Abb. 2. Infizierte Epidermiszelle (Vergr. 620 mal)

Zellschicht übergehen, beginnen sie sich nach allen Seiten zu verzweigen. Auch in das Zentrum hinein schreitet die Infektion fort, um endlich die ganze primäre Rinde bis zur Endodermis hin zu umfassen. Der Pilz dringt jedoch niemals in den Zentralzylinder ein, ebensowenig wird das meristematische Gewebe an der Wurzelspitze befallen.

2. Hyphen

Die Hyphen sind immer querwandlos. Der Durchmesser der Hyphen ist äußerst wechselnd und beträgt innerhalb der Wurzel 7 μ —14 μ . Durch unregelmäßige Ausbuchtungen der Wände erhalten die Hyphen ein charakteristisches Aussehen (Abb. 2). Die Außenhyphen haben einen

Durchmesser von $3,5\mu$ bis höchstens 7μ . Unmittelbar nach ihrem Eindringen in die Zelle beträgt der Hyphendurchmesser etwa das Doppelte (Abb. 3).

3. Vesikel

Von der zweiten Rindenschicht an beginnen Vesikel aufzutreten. Sie bilden sich meist intercellulär. Die Vesikel, die meist terminal an den



Abb. 3. Eindringende Hyphe
(Vergr. 612 mal)

Hyphen sitzen, sind rundliche bis ovale Anschwellungen von sehr wechselnder Größe (Abb. 4). Im Innern der Wurzel ist die Größe der Vesikel wohl oft nur eine reine Raumfrage. Sie schwankt zwischen minimal $35\mu \cdot 24,5\mu$ und maximal $77\mu \cdot 63\mu$. Die Außenvesikel sind im allgemeinen sehr viel größer und dabei nicht mehr langgestreckt wie in den Inter-cellularen, sondern rundlich (Abb. 5). Sie haben maximal einen Durchmesser von 105μ , der jedoch auch nur $38\mu \cdot 30,5\mu$ betragen kann.

In derselben Pflanze können neben einander Vesikel auftreten, die von

der Mutterhyphe durch keine Querwände abgegrenzt sind und solche, die eine Trennwand besitzen. Unterschiede in der Plasmastruktur sind zwischen



Abb. 4. Vesikelreicher Wurzellängsschnitt (Vergr. 215 mal)

offenen und geschlossenen Vesikeln nicht zu beobachten. Dennoch kann man die Vesikel nach ihrer Struktur in 4 verschiedene Formen aufteilen:

a) Vesikel mit vielen ungleich großen Öltropfen (Abb. 6), b) Vesikel mit gleichmäßig geformten Öltropfen innerhalb einer mitteldicken Wand (Abb. 7), c) Vesikel mit dünnerer Wand und ganz homogenem feingekörneltem Plasma (Abb. 7), d) Vesikel mit auffallend dicker Wand und 2 dunklen kugeligen Gebilden (Abb. 8). Diese 4 Vesikelformen können nebeneinander in derselben Pflanze auftreten. Alle beobachteten Außenvesikel gehören zum ersten und zweiten Typ.

4. Arbuskeln

Zum Unterschied von den Vesikeln kommen die haustorienartigen Differenzierungen der Hyphen, die GALLAUD (1905) „arbuscules“ nannte, lediglich intracellulär vor. Frühestens 4 Tage nach dem Eindringen des Pilzes in die Wurzel sind die ersten Arbuskeln zu sehen. Sie können außer in der ersten Rindenschicht in jeder Schicht bis zur Endodermis auftreten. Beim Tabak treten hauptsächlich sogenannte zusammengesetzte Arbuskeln auf („arbuscules composées“). Die Arbuskelbildung setzt hierbei an den lateralen Verzweigungen der Hyphen ein und unterbricht dadurch nicht das Wachstum der Hyphe, wie es bei der einfachen Arbuskelbildung geschieht (Abb. 9). Die Arbuskeln verlieren später ihre Struktur und sind mikroskopisch nur noch als ungestaltete Klumpen sichtbar.

5. Wirkung des Pilzes auf den Inhalt der Wurzelzellen

JANSE (1897), SHIBATA (1902), GALLAUD (1905) u. a. haben immer ein Verschwinden der Stärke aus der Wurzel bei Pilzinfektion festgestellt. Der Tabak zeigt im allgemeinen ein gleichartiges Verhalten, daneben

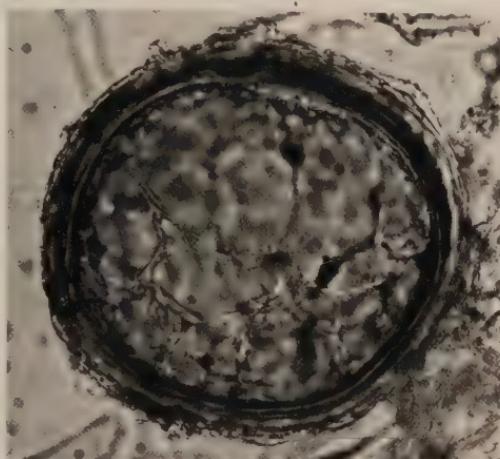


Abb. 5. Außenvesikel (Vergr. 612 mal)



Abb. 6. Vesikel intercellulär (Vergr. 612 mal)

wurden aber auch Stärkekörner und Hyphen in ein und derselben Zelle beobachtet. Jedoch fehlte die Stärke immer in den Zellen, die Arbuskeln führen. In gerbstoffhaltigen Zellen wurde nie Mycorrhiza beobachtet.

III. Infektionsmodus

Die systematische Stellung des endotrophen Mycorrhizapilzes ist nicht eindeutig geklärt, somit auch nicht seine Fortpflanzung. Es ist deshalb auch nur teilweise bekannt, wie der Pilz im Boden vorliegt und auf welche



Abb. 7. Vesikel Typ b und c (Vergr. 406 mal)

Weise er die Pflanze infiziert. Eine exakte Klärung dieser Frage ist nur mit Hilfe der Isolierung des Pilzes möglich; diese gelang aber bisher nicht. Daher wurde versucht, aus dem Infektionsverlauf bei unsterilen, künstlich infizierten Pflanzen Rückschlüsse auf den natürlichen Infektionsvorgang und auf das Verhalten des Pilzes im Boden zu ziehen.

1. Abhängigkeit von Infektionsträgern

Voraussetzung für eine Infektion ist die Existenz infektionsfähiger „Pilzkeime“ im Boden. Die Tatsache, daß gleichzeitig entnommener Boden von verschiedenen Standorten eine unterschiedliche Verpilzung ergab, kann zunächst auf eine nicht gleichmäßige Anhäufung infektionsfähigen Materials zurückgeführt werden. Diese Abhängigkeit zeigt besonders deutlich ein Versuch, bei dem Böden vom gleichen Standort, aber von unterschiedlichen Horizonten, also Erden mit unterschiedlicher biologischer Aktivität, auf ihre Fähigkeit, Mycorrhiza hervorzurufen, geprüft wurden. In Horizonterden vom Standort Zülpich (siehe S. 134) trat die Verpilzung ein:

A-Horizont (bis 30 cm)	nach 9 Tagen
B-Horizont (30—100 cm)	nach 13 Tagen
C-Horizont (>100 cm)	keine Verpilzung.

2. Arten der Infektion

Neben dem Stadium reinen Myzelwachstums in der Wurzel läßt sich eine Phase beobachten, in der der Pilz Vesikel bildet, so daß wir von 2 Entwicklungsstadien des Mycorrhizapilzes sprechen können. Es sollte nun untersucht werden, ob die Infektion und auch der „Entwicklungszyklus“ des Pilzes in der Wirtspflanze von seinem Entwicklungsstadium während der Infektion abhängig war. Hierzu wurde der Boden mit mycorrhiza-haltigen Wurzelstücken infiziert, wobei der Pilz jeweils in einem anderen Entwicklungsstadium vorlag.

Die Tabakpflanzen wurden in sterilisierter Erde gezogen. Um das infektionsfähige Material in engen Kontakt mit den Wurzeln zu bringen und um gleichzeitig eine normale Ernährung der Pflanze zu sichern, wurde das Wurzelsystem der Pflanze so geteilt, daß eine Hälfte in einem Zentrifugenröhrenchens, in dem die Erde mit verpilzten Wurzelstücken gemischt war, die andere Hälfte in der freien Erde lag.

a) Infektion mit jungen Wurzeln ohne Vesikel

Schon nach 4 Tagen zeigten die Wurzeln, die innerhalb des Zentrifugenröhrenchens wuchsen, eine Verpilzung mit der endotrophen Mycorrhiza. Diese Infektion ließ sich mikroskopisch beobachten: Zwischen den pilzhaltigen Wurzelstücken und den lebenden Wurzeln bestanden Myzelverbindungen, und man konnte diese Myzelien eindeutig als den Mycorrhizapilz erkennen: 1. zeigten die Hyphen nach dem Eintritt in die Wirtszelle die typische Knäuelung in der Epidermiszelle, 2. konnte man



Abb. 8. Vesikel Typ d (Vergr. 787 mal)



Abb. 9. Zusammengesetzte Arbuskeln (Vergr. 872 mal)

bei vorsichtiger Präparation das Auswachsen aus dem Wurzelstück, das Herüberwachsen des Myeels und den Eintritt dieser Hyphen in die Wirtszelle beobachten. In sehr großer Zahl wuchsen die Hyphen aus dem Gewebestück aus und befielen die Pflanze (Abb. 10).

Zuerst konnte man nur ein Auswachsen an den Schnittflächen beobachten und später nach dem Zerfall der primären Rinde auch ein

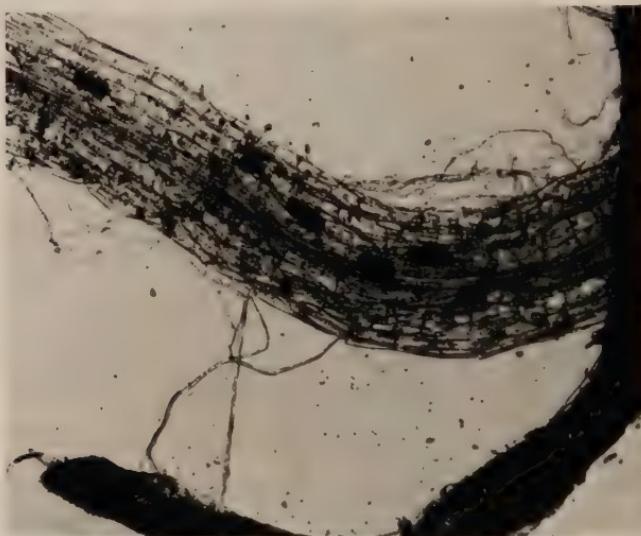


Abb. 10. Künstliche Infektion mit mycorrhizahaltigem Wurzelstück (Vergr. 88 mal)

allseitiges. Daneben gab es immer noch Wurzelstücke, die nur an den Enden Pilzmycel erkennen ließen, ein Umstand, der wahrscheinlich auf der unterschiedlichen Verrottung beruhte.

b) Infektion mit Wurzeln, in denen die Vesikelbildung abgeschlossen war

Die Infektion verlief hier ganz andersartig als in den Versuchen, in denen jüngere Wurzelstücke zur Infektion verwendet wurden. Die Wurzeln waren nach 8 Tagen infiziert. Die Infektion erfolgte weniger durch Überwachsen von Pilzmycel, sondern hauptsächlich durch auskeimende Vesikel. Auch außerhalb der Wurzel wurden Vesikel beobachtet mit Mycel, welches die Wirtszellen infizierte. Es besteht wohl kein Zweifel darüber, daß die Vesikel wirklich zur phycomycetoiden endotrophen Tabakmycorrhiza gehören (Abb. 11 u. 12). Innerhalb der Wirtspflanze setzt dann die Vesikelbildung nach 7—10 Wochen ein.

Die Infektion einer Pflanze kann also durch Auswachsen von Pilzmycel und durch auskeimende Vesikel erfolgen. Letztere Art der Infektion wird unter natürlichen Bedingungen die wichtigste und häufigste sein; denn die Vesikel, die auch von anderen als Dauerorgane angesehen werden, sind auf Grund ihrer Struktur nach dem Absterben der Wurzel gegen

ungünstige Umwelteinflüsse geschützter als das Mycel. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß nicht selten außerhalb der Wurzel Vesikel gefunden wurden, deren Verbindung zum Innenmycel klar erkennbar war und von denen die Infektion offensichtlich ausgegangen war. Diese Tatsache stimmt mit den Befunden von BUSICH (1913), PEYRONEL (1923) und vor allem MOSSE (1956) überein, die bei *Fragaria vesca* die Infektion mit isolierten Vesikeln im Boden mit Erfolg durchführte.



Abb. 11. Mycorrhizahaltige Wurzel mit Außenmycel und Außenvesikeln (Infektionsversuch; Vergr. 205 mal)



Abb. 12. Infizierende Hyphе mit Vesikel (Vergr. 612 mal)

Die Infektion ist also vom Entwicklungsstadium des Pilzes weitgehend unabhängig. Dagegen wird der „Entwicklungseyclus“ des Pilzes in der Pflanze davon beeinflußt, wie die unmittelbar nach erfolgter Infektion mit vesikelreichen Wurzelstücken einsetzende Vesikelbildung zeigt (siehe Versuch b). Das bedeutet, daß die Vesikelbildung nicht nur vom Zustand der Wirtspflanze abhängig ist, sondern ihr wohl eine endonome Rhythmisierung des Pilzes zugrunde liegt.

In der Natur wird also die Infektion auf mindestens zweierlei Weise erfolgen. Es war nun weiter zu prüfen, von welchen Faktoren die Infektion beeinflußt werden kann und ob die gefundenen Infektionsarten auch unter sterilen Bedingungen durchzuführen waren.

IV. Der Einfluß ökologischer Faktoren auf den Verpilzungsverlauf

Die Infektion einer Wirtspflanze durch den Pilz hängt in entscheidendem Umfange von ökologischen Bedingungen ab. Bei den Wechselbeziehungen, die zwischen Wirt, Pilz und Umwelt bestehen, ändern

Pflanze und Pilz ihr Verhalten zueinander, wenn ihre Lebensbedingungen andere werden. Da insbesondere die Bedeutung der Wurzelverpilzung am natürlichen Standort geklärt werden sollte, war zunächst zu prüfen, wie weit der Verpilzungsgrad durch Umweltfaktoren variiert werden konnte. Hat nämlich die Mycorrhiza bzw. der Verpilzungsgrad einen Einfluß auf die Entwicklung der Wirtspflanze, dann war anzunehmen, daß dieser Effekt je nach der Mycorrhizaentwicklung schwanken würde.

Nun konnten die vorliegenden Untersuchungen, wenn die Verhältnisse kontrollier- und vergleichbar sein sollten, nur im Gewächshaus durchgeführt werden. Hier liegen aber andere Wachstumsbedingungen als im Freiland vor. Da nach der Ansicht verschiedener Autoren (STAHL 1949, SIEVERS 1953) die Mycorrhiza im Gewächshaus schwächer ausgebildet wird, sollten vergleichende Untersuchungen über den Verpilzungsverlauf im Freiland und im Gewächshaus angestellt werden.

1. Verpilzung im Gewächshaus und Freiland

Der Verpilzungsverlauf im Freiland (Brachland) wurde mit dem im Gewächshaus und Frühbeet verglichen, um von den im Gewächshaus gewonnenen Ergebnissen gegebenenfalls auf Freilandverhältnisse schließen zu können.

Die Gewächshaus- und Frühbeetpflanzen wuchsen im gleichen Boden wie die Freilandpflanzen, jedoch in Töpfen, die regelmäßig begossen wurden. In dieser Versuchsanordnung konnte sich neben unterschiedlicher Temperatur, Luftfeuchtigkeit und verschiedenen Lichtverhältnissen später auch ein eventueller Nährstoffmangel bei den Topfpflanzen auswirken (Methodik siehe S. 114). Versuchszeit: 16. 6.—11. 8. 1955.

Im Gewächshaus und Freiland waren die Pflanzen nach 8 Tagen, im Frühbeet erst nach 14 Tagen verpiltzt (Abb. 13). Die weitere Verpilzung verlief im Freiland und im Gewächshaus annähernd gleichartig. Der Verpilzungsgrad nahm bis zum 28. 7. etwa gleichförmig zu, um dann nach einem Abfall wieder anzusteigen. Die Endverpilzung betrug im Gewächshaus 86% und im Freiland 80%. Die Frühbeetpflanzen zeigten auch einen kontinuierlichen Anstieg der Verpilzung, jedoch blieb die Endverpilzung (59%) weit hinter der der anderen Pflanzen zurück. Die größte Vesikel-dichte wurde im Freiland und im Gewächshaus zur gleichen Zeit beobachtet (4. 8.). Die Frühbeetpflanzen zeigten nur vereinzelte Vesikel. Der Verpilzungsverlauf im Gewächshaus unterschied sich von dem im Freiland nicht. Bei beiden setzte die Verpilzung gleichzeitig ein, und der Anstieg des Verpilzungsgrades zeigt, daß das Mycel bei ihnen im Laufe der Zeit auf das ganze Wurzelsystem übergegriffen hatte.

Zur Erklärung des unterschiedlichen Verpilzungsgrades zwischen Gewächshaus und Freiland einerseits und Frühbeet andererseits ist folgendes zu berücksichtigen: Die Gewächshaus- und Freilandpflanzen waren erheblich größer als die Frühbeetpflanzen. Der Unterschied zwischen Ge-

wächshaus und Frühbeet — beide Versuchsreihen standen in Töpfen — ist wohl auf eine günstigere Temperatur und die gleichmäßige Wasserversorgung im Gewächshaus zurückzuführen. Die bessere Entwicklung der Freilandpflanzen erklärt sich aus der größeren Ausdehnung des Wurzelsystems und der damit verbundenen besseren Nährstoffversorgung.

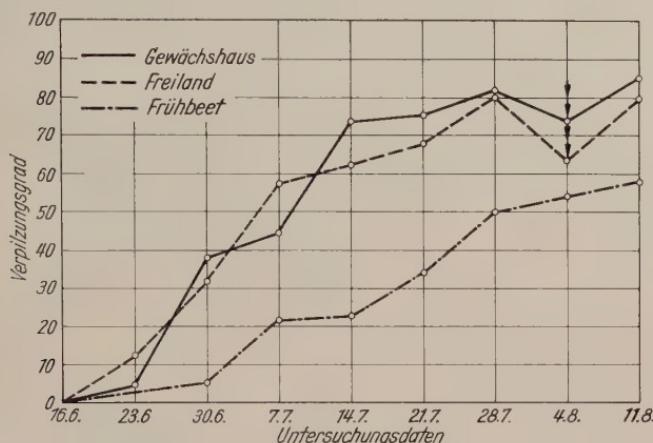


Abb. 13. Verpilzungsverlauf bei Tabakpflanzen im Freiland, Frühbeet und Gewächshaus.
Die Pfeile bedeuten größte Vesikeldichte

Unter den günstigeren Gewächshausbedingungen wirkte sich ein vielleicht vorhandener Nährstoffmangel im Topf weniger aus.

In diesem Versuch besteht also ein Zusammenhang zwischen dem Pflanzenwachstum und dem Verpilzungsgrad. Es ist nun wenig wahrscheinlich, daß die das Wachstum günstig bzw. ungünstig beeinflussenden Faktoren auch direkt die Pilzentwicklung gefördert bzw. gehemmt haben. Analog zu anderen Versuchen kann vielmehr angenommen werden, daß bei den stärker wachsenden Pflanzen dem Pilz mehr Assimilationsprodukte zur Verfügung standen.

Vergleicht man den Verpilzungsverlauf im Zusammenhang mit der Vesikelbildung, so wird bei Einsetzen der Vesikelbildung der Kurvenverlauf flacher, und der Verpilzungsgrad nimmt bei größter Vesikeldichte sogar ab (vgl. Abb. 13, Pfeile). Diese Verminderung kann dadurch erklärt werden, daß der Pilz größere Nährstoffmengen in die Vesikel einlagert (siehe S. 117). Hierbei werden Nährstoffe festgelegt, die dem Pilz zur Weiterentwicklung seines Mycels zunächst nicht zur Verfügung stehen. In den Frühbeetpflanzen blieb die Vesikelbildung gering, dementsprechend verringerte sich auch hier der Verpilzungsgrad nicht.

2. Jahreszeiten

Zur Prüfung der jahreszeitlichen Schwankungen des Verpilzungsverlaufs wurden im Frühjahr, Sommer und Herbst die Verpilzungsgrade bestimmt.

Die Versuche wurden nur im Gewächshaus durchgeführt, da, wie oben gezeigt wurde, die Verpilzung im Gewächshaus und Freiland gleichartig verläuft und der Tabak im Frühjahr und Herbst nur im Gewächshaus gezogen werden konnte (Methodik siehe S. 114). Versuchszeit: 21. 3.—23. 5. 1956, 16. 6.—11. 8. 1955, 14. 9.—13. 11. 1956.

Die Verpilzung nahm zu den verschiedenen Jahreszeiten jeweils einen anderen Verlauf. Im Frühjahr stieg die Verpilzung anfangs schnell an und hatte nach 14 Tagen schon einen Wert von 45% erreicht (siehe Abb. 14). Die Verpilzung nahm dann nur langsam zu. Nach 8 Wochen

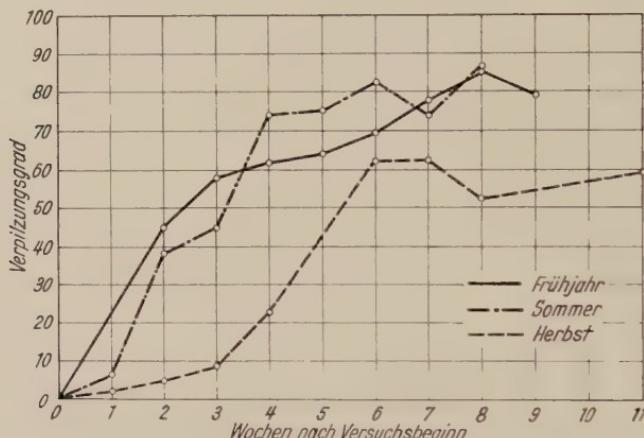


Abb. 14. Verpilzungsverlauf bei Tabakpflanzen zu verschiedenen Jahreszeiten in Standarderde

war die höchste Verpilzung mit 85% erreicht. Die Endverpilzung betrug 79% (Vesikelbildung). Im Sommer war die Verpilzung zunächst geringer als im Frühjahr, die maximale Verpilzung aber etwa gleich. Im Herbst verpilzten die Pflanzen in den ersten Wochen zunächst sehr langsam. Erst nach 3 Wochen erfolgte ein schnellerer Anstieg. Die maximale Verpilzung betrug 61%, die Endverpilzung 59%.

Der Verpilzungsgrad und der Verpilzungsverlauf sind also von den Jahreszeiten abhängig. In der Hauptvegetationszeit verpilzten die Pflanzen am intensivsten. Die schwächeren Verpilzung im Herbst steht im Einklang mit den Beobachtungen von STAHL (1949), SIEVERS (1953), BIRGEL (1953), die im Winter im Gewächshaus überhaupt keine mycorrhizahaltigen Pflanzen aufziehen konnten. Die genannten Autoren führen diesen Befund auf den geringeren Lichteinfall zurück. Unter dieser Voraussetzung war also eine verminderte Verpilzung zu erwarten, wenn künstlich die Lichtintensität bzw. die assimilierende Fläche vermindert wurde. Dazu wurden Versuche im Lichtkasten und solche mit entblätterten Pflanzen durchgeführt.

3. Pflanzenzustand

a) Lichtkasten

Der Verpilzungsverlauf von Tabakpflanzen wurde a) unter einem Lichtkasten (GAST 1936) bei 50% Lichteinfall und b) bei Pflanzen ermittelt, die zwar unter vollem Licht standen, deren Blätter jedoch bis auf die obersten laufend entfernt wurden. Die Kontrollpflanzen blieben unbehandelt. Die Versuche wurden im Gewächshaus durchgeführt (Methodik siehe S. 114). Versuchszeit: 13. 7. bis 23. 9. 1955.

Sowohl die Lichtkasten- als auch die entblätterten Pflanzen verpilzten erheblich geringer als die Kontrollpflanzen. Die Endverpilzung (nach

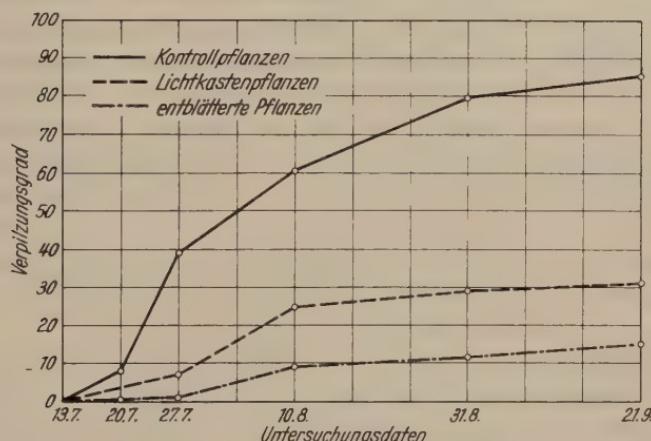


Abb. 15. Verpilzungsverlauf bei Lichtkastenpflanzen, entblätterten sowie un behandelten Pflanzen

10 Wochen) betrug bei den entblätterten Pflanzen 15% und im Lichtkasten 31% gegenüber 85% bei den Kontrollpflanzen (Abb. 15). Die Mycorrhiza hat sich also in den Pflanzen, deren Assimilationsleistung, sei es durch verminderter Lichteinfall, sei es durch verminderter Assimulationsfläche, herabgesetzt war, merklich weniger ausgebreitet als in den normal gezogenen Kontrollpflanzen. Wir finden hier also eine Parallele zu den geringen Verpilzungsgraden der im Herbst (siehe S. 124) und im Frühbeet (siehe S. 122) gezogenen Pflanzen. Infolge der herabgesetzten Assimilation hatten die Lichtkastenpflanzen und entblätterten Pflanzen kaum Stärke in ihren Wurzeln gespeichert. Man darf aus diesen Ergebnissen wohl folgern, daß das fast vollständige Fehlen von Speicherstoffen in den Wurzeln, ein begrenzender Faktor für die Ausbreitung des Pilzes war.

b) Alter der Pflanze

Wenn diese Überlegungen richtig waren, so mußte eine mycorrhizafrei aufgezogene ausgewachsene Pflanze viel intensiver verpilzen als junge Pflanzen, da die älteren schon große Mengen von Assimulationsprodukten

in ihren Wurzeln gespeichert haben. Es konnte jedoch möglich sein, daß andere Faktoren das Ergebnis störten, so vor allem die zum Teil recht fortgeschrittene Verholzung in älteren Wurzeln.

Der Verpilzungsverlauf von 19 Wochen alten Tabakpflanzen wurde mit dem von 6 Wochen alten Pflanzen verglichen. Versuchszeit: 14. 9.—16. 11. 1956.

Der Verpilzungsgrad der jungen Pflanzen lag wesentlich höher als der der ausgewachsenen.

Zur Erklärung dieses Ergebnisses ist zu berücksichtigen, daß wohl u. a. durch die Verholzung der Wurzeln dem Pilzbefall und der -ausbreitung ein mechanischer Widerstand entgegengesetzt wurde. Vergleicht man nämlich die jüngeren Wurzeln der ausgewachsenen Pflanzen mit denen der jungen Pflanzen, so war der Verpilzungsgrad der ausgewachsenen Pflanzen sogar noch höher. Diese relativ stärkere Verpilzung der ausgewachsenen Pflanzen wurde auch dadurch sichtbar, daß der Pilz die ihm zur Verfügung stehenden Wurzelteile viel schneller und intensiver als in den jungen Pflanzen durchdrang — die Myceldichte kann im Verpilzungsgrad nicht erfaßt werden. Es zeigt sich also, daß die Ausbreitung der Mycorrhiza innerhalb der Wurzeln erleichtert wird, wenn der Pflanze genügend Assimilationsprodukte zur Verfügung stehen.

Die Vesikelbildung setzte bei beiden Pflanzenarten zum gleichen Zeitpunkt ein. Der gleichzeitige Beginn der Vesikelbildung bei alten und jungen Pflanzen deutet wiederum an, daß die Vesikelbildung vom Zustand der Wirtspflanze weitgehend unabhängig ist.

Fassen wir noch einmal zusammen: *Die Verpilzung der Tabakpflanzen durch die Mycorrhiza ist im Spätfrühjahr und Sommer am stärksten. Dabei ist es gleichgültig, ob die Pflanzen im Gewächshaus oder Freiland gehalten werden. Unter Gewächshausbedingungen verpilzt der Tabak im Herbst und Winter weniger als zu den anderen Jahreszeiten. Diese Verminderung steht, wie der Lichtkastenversuch, Versuche mit entblätterten Pflanzen sowie Pflanzen verschiedenen Alters zeigen, im Zusammenhang mit der herabgesetzten Assimilationsleistung der Pflanze.*

4. Modellböden

Die in den Versuchen mit verschiedenen Böden gefundenen unterschiedlichen Verpilzungsgrade waren vor allem auf eine ungleichmäßig starke Anhäufung des infektionsfähigen Materials in den einzelnen Bodenarten zurückzuführen (siehe S. 118). Nun ist aber anzunehmen, daß darüber hinaus auch biologische, physikalische und chemische Faktoren im Boden die Infektion und die Ausbreitung des Pilzes in der Wirtspflanze beeinflussen können.

Es lag nun aber nahe, im Hinblick auf die Wechselwirkungen, die häufig zwischen Bodenpilzen und Humusgehalt des Bodens zu beobachten

sind, mit Hilfe zweier extremer Humus- bzw. Rohhumustypen, nämlich Torf und Fichtenstreu, die Bedeutung der organischen Substanz im Boden aufzuzeigen.

Besonders eingehend wurden solche Verhältnisse bei pathogenen Organismen untersucht. So ist z. B. Weizen auf sandigem Boden besonders durch *Ophiobolus graminis* gefährdet, kolloid- und humusreiche Böden besitzen dagegen eine ausgeprägte Schutzwirkung gegen das Auftreten der Krankheit (MORITZ 1931, WINTER 1940). Diese Schutzwirkung kann einmal die saprophytische Phase des pathogenen Parasiten, zum anderen auch seine parasitische Phase umfassen, d. h. entweder wird der Pilz schon außerhalb der Pflanze in seiner Entwicklung gehemmt; zum anderen besteht auch die Möglichkeit, daß sich auf verschiedenem Milieu die Reaktionslage der Pflanze gegenüber dem Pilz verändert.

Eine Beeinflussung der „saprophytischen“ Phase würde also für die endotrophe Mycorrhiza einen veränderten Infektionsbeginn, die der „parasitischen“ Phase dagegen einen anderen Verpilzungsverlauf zur Folge haben.

Es wurde die Verpilzung in Modellböden, die aus Mischungen von Mineralböden mit Torf bzw. Fichtenstreu hergestellt wurden, geprüft.

a) Torf

Der Gehalt des Bodens an organischen Substanzen wird durch Torfzusatz erhöht. Es ist bekannt, daß der Torf eine Reihe pflanzenphysiologisch wirksamer Substanzen enthält (FLAIG 1953, NIGGEMANN 1955). SCHAFFNIT (1953) fand, daß Sphagnumtorf sowohl durch biotische als auch durch abiotische Faktoren Roggenkeimlingen einen starken Schutz gegen die vom Boden her erfolgende Infektion mit *Fusarium nivale* verleiht.

α) Torfbeimischung: Sphagnumtorf wurde mit Standarderde in dem Volumenverhältnis 0:10, 1:10, 1:9, 1:7, 1:5, 1:4, 1:2, 1:1, 1:0,5 gemischt, mit Tabak bepflanzt (Methodik siehe S. 114) und die Verpilzung beobachtet. Versuchszeit: 30. 3.—8. 6. 1955.

Der Infektionsbeginn war von der Höhe der Torfbeimischungen abhängig: Je höher der Torfanteil war, um so später setzte die Verpilzung ein. 14 Tage nach Versuchsbeginn waren nur die Pflanzen verpilzt, die in Bodengemischen mit 20% Torf und weniger standen. Nach 4 Wochen betrug der Verpilzungsgrad in der Versuchsreihe mit dem höchsten Torfzusatz (67%) erst 2%. In den darauffolgenden Wochen nahm die Verpilzung bei den Pflanzen, deren Infektionsbeginn verzögert war, sehr schnell zu, so daß bei Versuchsende in allen Gemischen eine gute Endverpilzung festzustellen war (Abb. 16).

Bevor dieser hemmende Effekt des Torfes auf die Infektion gedeutet werden konnte, mußten folgende Fragen geklärt werden: 1. Beruhte die Wirkung auf einer einfachen Verdünnung der pilzhaltigen Standarderde, oder wurde 2. die Pflanze durch den Torf vorübergehend resistent gegenüber dem Pilz? 3. Konnte die verzögerte Infektion allein durch die

Veränderung der physikalischen Struktur durch die Torfbeimischung erklärt werden, oder wurde 4. die Pilzentwicklung durch Substanzen aus dem Torf hemmend beeinflußt?

ad 1. Um zu klären, ob es sich um einen reinen Verdünnungseffekt handelte, wurde Standarderde mit Quarzsand verdünnt.

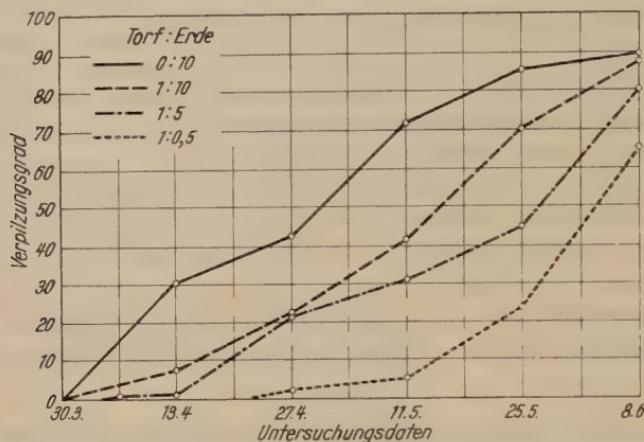


Abb. 16. Verpilzungsverlauf bei Tabakpflanzen in Standarderde-Torf-Gemischen verschiedener Mischungsverhältnisse

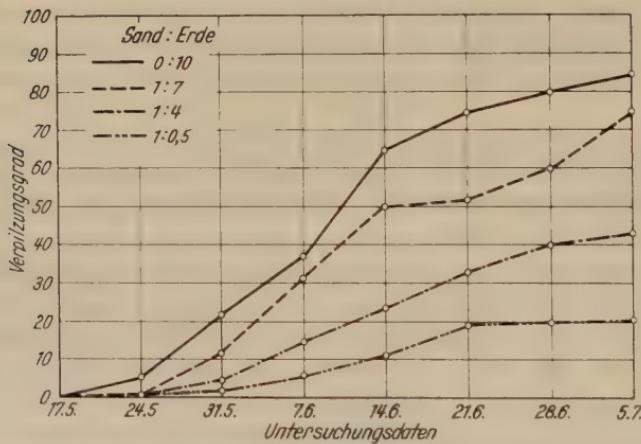


Abb. 17. Verpilzungsverlauf bei Tabakpflanzen in Standarderde-Sand-Gemischen verschiedener Mischungsverhältnisse

Die Verdünnungen wurden wieder im Volumenverhältnis 0:10, 1:7, 1:4, 1:0,5 hergestellt (Methodik siehe S. 114). Versuchszeit: 17. 5.—5. 7. 1955.

Nach 14 Tagen trat in allen Verdünnungsstufen eine Verpilzung auf. Sie war um so größer, je höher der Erdeanteil war (Abb. 17). Der weitere Infektionsverlauf läßt sich nicht mit dem im Torf vergleichen, da der Versuch zu einem anderen Zeitpunkt angesetzt wurde und die Versuchsdauer

kürzer war. Wesentlich war aber, daß der Infektionsbeginn unabhängig von der Konzentration der Standarderde war. Die bei Torfbeimischung auftretende Infektionsverzögerung war also kein reiner Verdünnungseffekt.

ad 2. Die Frage, ob die Pflanze im Torf vorübergehend gegenüber dem Pilz resistent wird, wurde in folgendem Versuch geklärt:

6 Wochen alte Tabakpflanzen wurden 8 Wochen lang in Torf gezogen und dann in Standarderde umgepflanzt.

Wenn die Pflanze im Torf gegenüber dem Pilz resistent geworden wäre, hätte man erwarten können, daß der Verpilzungsbeginn verzögert würde. Die Verpilzung verlief jedoch normal. Schon nach 14 Tagen war eine Verpilzung von 25% erreicht. Es kann sich also nicht um eine Resistenzerscheinung handeln.

β) Torfextrakt: ad 3 und 4. Mit der Torfbeimischung zu Mineralböden veränderten wir auch seine physikalische Struktur und steigerten insbesondere damit das Wasseraufsaugungsvermögen des Bodens.

Um einen Einfluß solcher Faktoren auf den Verpilzungsverlauf auszuschalten, wurde Standarderde mit Torfextrakt (siehe S. 114) behandelt. Mit dieser Versuchs-anordnung konnte gleichzeitig auch ein möglicher Einfluß wasserlöslicher Stoffe aus dem Torf erfaßt werden. Je 2 kg Standarderde wurden in glasierte Kulturgefäße (System Prof. VOLK) gefüllt und mit

200 ml Torfextrakt +	0 ml Leitungswasser
100 ml Torfextrakt +	100 ml Leitungswasser
50 ml Torfextrakt +	150 ml Leitungswasser
25 ml Torfextrakt +	175 ml Leitungswasser
0 ml Torfextrakt +	200 ml Leitungswasser

zu Versuchsbeginn begossen. Im weiteren Verlauf wurde die Bodenfeuchtigkeit mit Leitungswasser konstant gehalten. Versuchszeit: 20. 4.—22. 6. 1955.

Analog zu den Standarderde-Torf-Gemischen ergab sich auch hier eine Abhängigkeit des Infektionsbeginns von der Menge des zugegebenen Torfextraktes. Die mit hohen Extraktkonzentrationen behandelten Pflanzen verpilzten später (Abb. 18).

Die verzögerte Infektion bei den in Torf-Erde-Gemischen wachsenden Pflanzen beruht also weder auf einer Verdünnung des infektionsfähigen Materials, noch auf Resistenzerscheinungen, noch kann sie allein mit einem Einfluß der veränderten physikalischen Struktur des Bodens erklärt werden. Die Ergebnisse des Extraktversuches zeigen vielmehr, daß hier eine Interferenz wasserlöslicher Wirkstoffe aus dem Torf vorliegt. Diese Substanzen hemmen die Entwicklung des Pilzes außerhalb der Pflanze, denn nur der Zeitpunkt der Infektion ist verzögert. Nach erfolgter Infektion breitet sich der Endophyt normal in der Wurzel aus. Die Natur und der Wirkungsmechanismus der hemmenden Stoffe wurde nicht näher untersucht; denn es kam vor allem darauf an, die verschiedenen die Mycorrhiza beeinflussenden Faktoren zu erkennen, um die Bedeutung des Pilzes für die Wirtspflanze — unter bekannten Bedingungen — zu klären.

b) Fichtenstreu

Nach den Beobachtungen über den hemmenden Einfluß des Torfes bzw. Torfextraktes auf den Mycorrhizabefall sollte nun untersucht werden, ob die Verpilzung durch bestimmte Wirkstoffsysteme im Boden auch stimuliert werden konnte. MELIN (1946) zeigte, daß Laubstreu- und

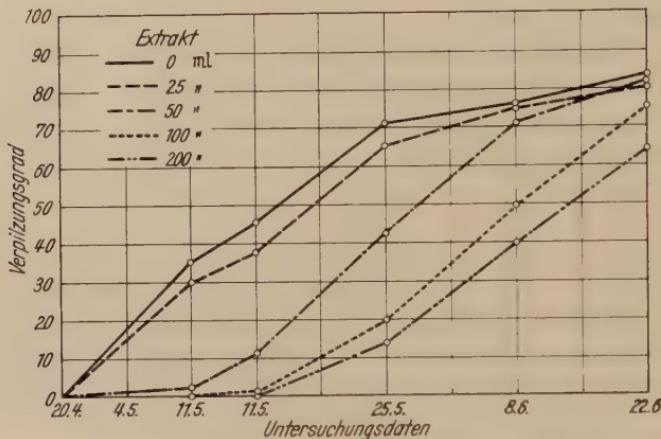


Abb. 18. Verpilzungsverlauf bei Tabakpflanzen in Standarderde mit verschiedenen hohen Torfextractzusätzen

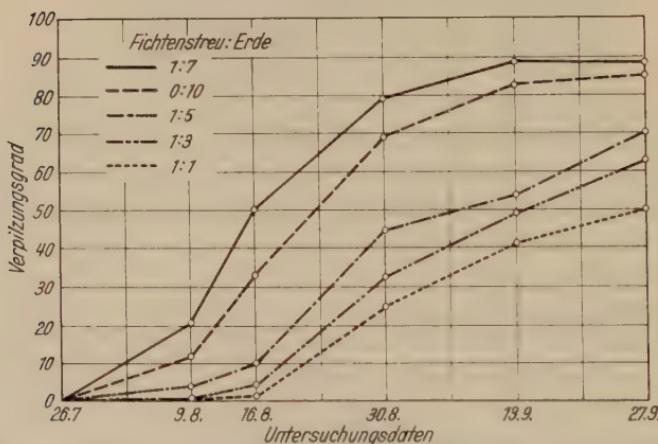


Abb. 19. Verpilzungsverlauf bei Tabakpflanzen in Standarderde-Fichtenstreu-Gemischen verschiedener Mischungsverhältnisse

Fichtenstreuextrakte Stoffe enthalten, die das Wachstum vieler *Hymenomyceten* und auch *Phycomyces*-Arten in bestimmten Konzentrationen fördern.

α) Fichtenstreubeimischung. Standarderde und Fichtenstreu wurden im Volumenverhältnis 0:10, 1:10, 1:9, 1:7, 1:5, 1:3, 1:2, 1:1 gemischt und mit Tabak bepflanzt (Methodik siehe S. 114). Versuchszeit: 26. 7.—27. 9. 1955.

Die Pflanzen mit hohem Fichtenstreuanteil verpilzten langsamer und weniger stark als die übrigen (1:1—1:5), ohne daß der Infektionsbeginn — im Gegensatz zum Torf — verzögert war. Die Verpilzung in der Konzentration 1:7 lag dagegen zu jedem Zeitpunkt des Versuchs oberhalb der Kontrolle (Abb. 19).

Die Wirkung der Fichtenstreu auf den Verpilzungsgrad ist also konzentrationsabhängig. Nur in hohen Konzentrationen wird er vermindert, in

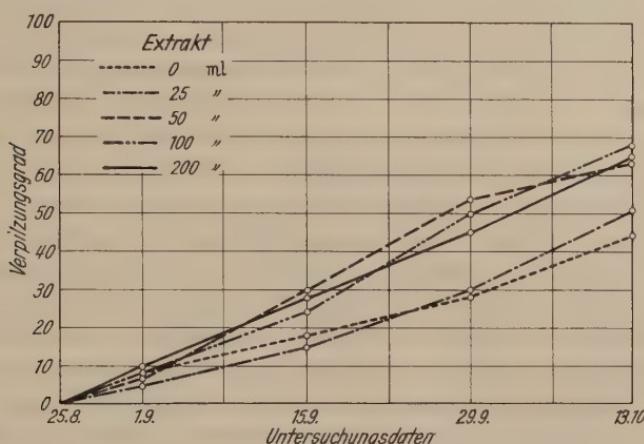


Abb. 20. Verpilzungsverlauf bei Tabakpflanzen in Standarderde mit verschiedenen hohen Fichtenstreuextraktzusätzen

größerer Verdünnung dagegen kann die Verpilzung stimuliert werden. Es muß aber auch berücksichtigt werden, daß die physikalische Struktur des Bodens durch die Fichtenstreubeimischung verändert wurde. Um diesen Faktor zu eliminieren, wurden analog zu den Torfextrakten auch Versuche mit wäßrigen Fichtenstreuauszügen durchgeführt.

β) Fichtenstreuextrakt. Die Pflanzen standen wieder in Standarderde, die zu Versuchsbeginn mit

200 ml Fichtenstreuextrakt + 0 ml Leitungswasser
 100 ml Fichtenstreuextrakt + 100 ml Leitungswasser
 50 ml Fichtenstreuextrakt + 150 ml Leitungswasser
 25 ml Fichtenstreuextrakt + 175 ml Leitungswasser
 0 ml Fichtenstreuextrakt + 200 ml Leitungswasser

begossen wurden. Im weiteren Verlauf wurde die Bodenfeuchtigkeit mit Leitungswasser konstant gehalten. Versuchszeit: 25. 8.—13. 10. 1955.

Auch in diesen Versuchen ergab sich eine Abhängigkeit des Verpilzungsverlaufs von der Menge des zugegebenen Fichtenstreuextraktes. Bei fast gleich starker Anfangsverpilzung breitete sich die Mycorrhiza bis zum Versuchsende in den Pflanzen, die die größten Extraktmengen erhielten, schneller aus als in den Kontrollpflanzen und in den nur mit 25 ml Extrakt begossenen Pflanzen (siehe Abb. 20). Die Mycorrhizaentwicklung wird also

durch die Fichtenstreu bzw. den Streuextrakt stimuliert. Es kann sich hier nur um den Einfluß von wasserlöslichen Stoffen aus der Fichtenstreu handeln, da die anderen Faktoren (siehe S. 127 ff.) durch die letzte Versuchsanordnung ausgeschaltet waren.

Die Wirkung der Fichtenstreu auf den Pilz kann zunächst dadurch erklärt werden, daß die Entwicklung der Infektionsträger im Boden gefördert und somit die Wurzel zahlreicher infiziert wird. Es wäre aber auch denkbar, daß komplizierter gebaute Stoffe aus der Fichtenstreu in der Pflanze aktiv werden und die Mycelentwicklung innerhalb der Wurzel direkt oder indirekt über eine veränderte Reaktionslage der Pflanze fördern. BLANCHARD (1951), BRIAN (1951) und WINTER (1951) konnten nämlich zeigen, daß höhere Pflanzen hochmolekulare organische Substanzen aus natürlichen Böden aufnehmen und daß solche Stoffe auch noch in den oberirdischen Pflanzenteilen unverändert vorliegen.

Diese Alternative wäre nur durch Auszählen der Eintrittstellen zu klären, das stößt jedoch auf große methodische Schwierigkeiten. *Der Boden spielt also nicht nur als Träger infektionsfähigen Materials für die Mycorrhizaausbildung eine Rolle, sondern es muß auch, wie die Modellbödenversuche zeigen, mit einem Einfluß edaphischer Faktoren auf die Infektion und die Pilzausbreitung im Wirt gerechnet werden. Dieser Einfluß kann ein hemmender (Torf) oder auch ein fördernder (Fichtenstreu) sein.*

V. Versuche zur Sterilaufzucht

Nach den bei den ökologischen Untersuchungen gemachten Erfahrungen schien die „Reinkultur“ des Pilzes denkbar als sterile Aufzucht mycorrhizahaltiger Pflanzen.

Versuche zur Isolierung des Pilzes auf dem Agar-Substrat wurden schon vorher unternommen. Folgende Nährsubstrate wurden verwendet: 1. Burgeff-Agar. — 2. Burgeff-Agar mit Zusätzen von steril filtrierten Kaltwasserextrakten von Tabakblättern und -wurzeln in verschiedenen Konzentrationen. — 3. Hanfsamenagar und Agar mit steril filtrierten Extrakten aus zerkleinerten Hanfsamen. — 4. Tabaksamenagar, der wie Hanfsamenagar behandelt wurde, jedoch Burgeff-Agar als Grundsubstrat enthielt. Die Sterilisierung der Impfstücke erfolgte mit Lösungen von Quecksilberchlorid, Chlorkalk, Bromwasser und Perhydrol.

Bei den Versuchen über den Infektionsmodus wurde festgestellt, daß die Pflanze den Pilz zum Auswachsen anregt. Darum wurden Versuche mit steril aufgezogenen Pflanzen, die auf Nähragar nach STEINBERG (1947) in Erlenmeyer-Kolben wuchsen und sterilisierten Wurzelstücken durchgeführt, die in die Nähe der Wurzeln gebracht wurden. Daneben wurden Gewebekulturen von Tabakwurzeln angesetzt, die auf Agar nach HILDEBRANDT (1946) wuchsen und mit sterilisierten mycorrhizahaltigen Wurzelschnitten zusammengebracht wurden.

Weder bei der Sterilaufzucht noch in der Gewebekultur wuchs der Pilz aus dem Impfstück aus. Die Versuche wurden im Herbst 1956 ohne Erfolg abgebrochen, ohne einen Anhaltspunkt dafür bekommen zu haben, warum der Pilz nicht auswächst. Wahrscheinlich entfernen wir uns auf dem künstlichen Substrat so weit von den natürlichen Bedingungen, daß

es dem Pilz auch mit Hilfe einer unter künstlichen Bedingungen wachsenden Pflanze nicht möglich ist, auszuwachsen. Die Bedeutung der endotrophen Mycorrhiza für die Pflanze konnte also mit Hilfe der Sterilkultur nicht gelöst werden.

Es erscheint jedoch auch fraglich, ob sich die Ergebnisse der Sterilkultur ohne weiteres auf natürliche Verhältnisse übertragen lassen. WINTER u. VON RÜMCKER (1950) konnten nämlich zeigen, daß durch Ausschalten der spezifischen Rhizosphärenflora in der Sterilkultur Pflanze und Pilz ihr Verhältnis zueinander stark ändern können. So wird z. B. Mais in steriler Kultur von *Fusarium culmorum* rasch abgetötet, während er im natürlichen Ackerboden durch den Pilz gefördert wird.

Es mußten deshalb andere Wege gefunden werden, um das Zusammenleben von Pilz und Pflanze untersuchen zu können.

VI. Die Bedeutung des Pilzes für die Jugendentwicklung der Pflanze

Über die phycomycetoide-endotrophe Mycorrhiza liegen bislang keine Untersuchungen vor, die den Einfluß des Pilzes auf die Pflanze eindeutig klären. Aus den schon beschriebenen Versuchen geht hervor, daß die Ausbreitung des Pilzes in der Wurzel auch vom Zustand der Wirtspflanze abhängig ist. Es sollte jetzt geprüft werden, ob umgekehrt auch der Pilz, der ja die absorptionsfähigen Wurzeln nahezu vollständig durchdringen kann, die Entwicklung der Pflanzen beeinflußt.

Nun kann man aber weder aus rein morphologischen Beobachtungen auf Parasitismus (BURGES 1936) oder Symbiose (BUTLER 1939) schließen, noch ist es möglich, die Bedeutung des Pilzes für die Wirtspflanze zu erfassen, wenn im Experiment für mycorrhizahaltige und mycorrhizafreie Pflanzen unterschiedliche Nährsubstrate verwendet werden (DEMETER 1923). Voraussetzung für die Untersuchung über den Einfluß des Endophyten auf die Entwicklung der Wirtspflanze ist eine Methode, die es möglich macht, mycorrhizahaltige und -freie Pflanzen unter gleichen Bedingungen nebeneinander aufzuziehen. Da die Reinkultur des Pilzes nicht gelang, wurde eine Methode entwickelt, die einen solchen Vergleich gestattet und die auch ökologischen Bedingungen weitgehend gerecht wird.

1. Spezielle Methoden

a) Implantationsmethode

Zur Infizierung der unverpilzten Pflanze mit der endotrophen Mycorrhiza wird die primäre Rinde der Hauptwurzel angeschnitten und in die Wunde ein mit Mycorrhiza befallener Wurzelschnitt sorgfältig hineingelegt. Der Wurzelschnitt wird vorher mikroskopisch auf seine Verpilzung geprüft, in steriles Wasser gewaschen und dann zur Infektion benutzt. Mit einem schmalen Streifen „Tesafilm“ wird die Infektionsstelle wieder verschlossen. Die primäre Rinde der Kontrollpflanze wird angeschnitten und ein unverpilztes Wurzelstück eingelegt.

In der Wasserkultur breitet sich die Mycorrhiza bei dieser Methode schnell aus. Im Boden wurden zusätzlich verpilzte Wurzelstücke in die Nähe der Wurzeln

gebracht, um eine gute Allgemeinverpilzung zu sichern. Die Kontrollpflanzen wurden mit unverpilzten Wurzeln beschickt, um einen Einfluß der Wurzelstücke als solche auszuschalten.

Bei Versuchsende wurden die Pflanzen sorgfältig auf einem Haarsieb mittels eines Wasserstrahls von der Erde getrennt, durch vorsichtiges Bürsten wurden die Wurzeln von der letzten Erde befreit, in aqua dest. gewaschen, Wurzel und Sproß getrennt bei 105° C 12 Std getrocknet und anschließend gewogen.

In den nun folgenden Versuchen wurden immer 6 Wochen alte Tabakpflanzen auf die oben beschriebene Weise infiziert und im Gewächshaus unter den angegebenen Bedingungen (siehe S. 114) gehalten.

b) Statistische Sicherung

Die Prüfung auf Signifikanz festgestellter Ertragsunterschiede erfolgte nach dem *t*-Test.

2. Bodenversuche

a) Normaler Boden

Zunächst wurde in Brachlanderde (sandiger Lehm), die den Mycorrhizapilz nicht enthielt, die Entwicklung mycorrhizahaltiger und mycorrhizafreier Pflanzen miteinander verglichen. Versuchszeit: 28. 4.—9. 6. 1955.

Die mycorrhizahaltigen Tabakpflanzen waren besser als die mycorrhiza-freien entwickelt. Diese Entwicklungssteigerung betrug bei den oberirdischen Teilen 64,6%, bei den Wurzeln 65,1% (siehe Tab. 1).

Es ergab sich nun die Frage nach der Ursache dieser Stimulierung. Wenn sie lediglich auf einer durch die Mycorrhiza begünstigten Nährstoffzufuhr beruhte, dann konnte man erwarten, daß dieser Effekt auf nährstoff-

Tabelle 1. *Die Beeinflussung der Entwicklung von Tabakpflanzen durch die Mycorrhiza in Brachlanderde*

	Trockengewichte in g		P-Wert
	Ohne Mycorrhiza	Mit Mycorrhiza	
Sproß	1,22	2,01	0,02—0,01
Wurzel	0,43	0,71	0,01—0,001

armem Substrat stärker in Erscheinung tritt als auf nährstoffreichem.

b) Gedünghter Untergrundboden

Tabakpflanzen mit und ohne Mycorrhiza wurden nun auf nährstoffarmem Untergrundboden¹ gezogen, der auf Grund seiner natürlichen Lagerung biologisch inaktiv war.

Zu diesem Boden (1,5 kg) wurde

a) kein Dünger = Düngestufe 0, b) 0,09 g Nitrophoska = Düngestufe I, c) 0,18 g Nitrophoska = Düngestufe II, d) 0,36 g Nitrophoska = Düngestufe III gegeben.

¹ Es handelt sich hier um eine tiefer als 1 m liegende typische Schwarzerde unter kalkreicher Braunerde als B-Horizont und einem sehr fruchtbaren, sandigen Lehm als A-Horizont aus der Nähe von Zülpich (pH in KCl 6,8; K₂O 4 mg; P₂O₅ 2 mg in 100 g Boden; CaCO₃ 1,8%; T-Wert 13,7; S-Wert 12,8; V 93%). Die chemische Bodenuntersuchung wurde dankenswerterweise von der Landwirtschaftskammer Bonn durchgeführt.

Der Dünger wurde fein gemörsert und topfweise unter die Erde gemischt. Nitrophoska enthält die Hauptnährstoffe in der Zusammensetzung N 11,5%, P₂O₅ 8,5%, K₂O 18%.

a) Die mit Mycorrhiza infizierten Pflanzen entwickelten sich in allen Düngestufen erheblich besser als die mycorrhizafreien (siehe Abb. 21).

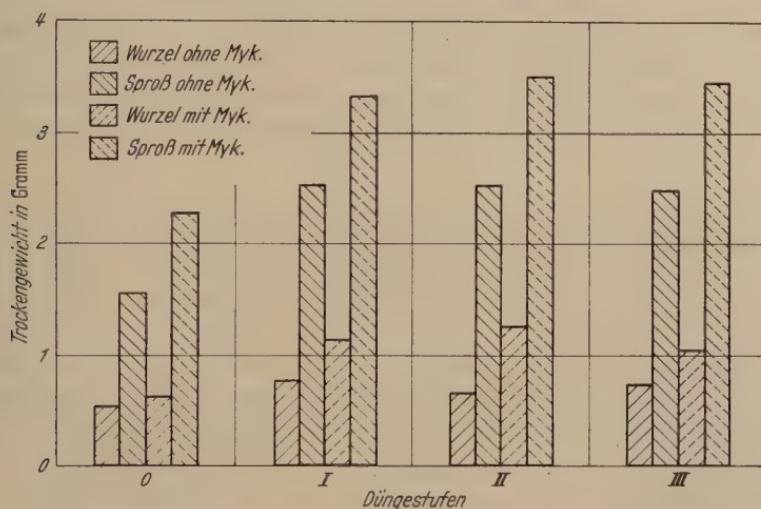


Abb. 21. Die Entwicklung mycorrhizahaltiger und mycorrhizafreier Tabakpflanzen in Untergrundboden mit verschiedenen hohen Düngergaben

Dabei war das Sproßgewicht mehr als das Wurzelgewicht gefördert. Die folgenden Ausführungen beziehen sich deshalb vor allem auf das Sproßgewicht.

b) Die gedüngten Pflanzen, sowohl die pilzhaltigen als auch die pilzfreien, wuchsen besser als die entsprechenden nichtgedüngten. Die verschiedenen Nährstoffmengen zeigten jedoch keine unterschiedliche Wirkung. Aus der gleichbleibenden Entwicklung in allen drei Düngestufen folgt, daß der unter den besonderen Bodenbedingungen zu erzielende Höchstertrag schon bei Gabe I erreicht war. Andere Wachstumselemente, wahrscheinlich auch die physikalische Struktur des Bodens, werden hier als begrenzende Faktoren aufgetreten sein.

c) Der durch die Mycorrhiza bedingte Ertragszuwachs war unabhängig von der Nährstoffzufuhr, d. h. die Förderung der verpilzten Pflanzen war gegenüber den nichtverpilzten in allen Düngestufen annähernd gleich stark. Auch war die durch Nährstoffe bedingte Entwicklungssteigerung nicht vom Mycorrhizabefall abhängig. Diese Förderung betrug bei mycorrhizahaltigen und mycorrhizafreien Pflanzen etwa 50%. Der von den pilzfreien Pflanzen durch Nährstoffzufuhr erzielte Ertrag wurde von den mycorrhizahaltigen bereits ohne Düngung zu 93% erreicht.

Unter den gegebenen Bedingungen konnten also die Mycorrhizapflanzen die durch Nährstoffmangel verursachte schwächere Entwicklung weitgehend ausgleichen. Doch kann aus diesen Versuchsergebnissen nicht gefolgert werden, daß die bessere Entwicklung der pilzhaltigen Pflanzen dadurch bedingt ist, daß der Pilz die Aufnahme der im Boden verfügbaren Nährstoffe begünstigt; denn die Entwicklungsdifferenzen zwischen verpilzten und unverpilzten Pflanzen glichen sich auch bei hoher Nährstoffzufuhr nicht an, sondern blieben in allen Düngestufen gleich groß.

Die Bedeutung der Mycorrhiza für die Wirtspflanze kann demnach nicht darin bestehen, daß sie eine erhöhte Aufnahme mineralischer Nährstoffe vermittelt.

3. Wasserkulturen

Die Jugendentwicklung der Tabakpflanze wird, wie die vorigen Versuche gezeigt haben, auf verschiedenen Böden unabhängig von deren physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften durch die Mycorrhiza gefördert. Nun ist aber ein Boden ein mehr oder weniger heterogenes System, in dem eine isolierte Untersuchung einzelner Faktoren nicht leicht möglich ist. Demgegenüber bietet die Wasserkultur den Vorteil, daß a) das Nährmedium einheitlich zusammengesetzt, b) eine definierte Variierung der Wachstumselemente möglich ist und man c) durch weitgehende Ausschaltung der Rhizosphärenflora der Sterilkultur näher kommt.

a) pH-Versuch

Im allgemeinen ist die optimale Entwicklung der Pflanze an einen bestimmten pH-Bereich des Nährsubstrates gebunden (der Tabak bevorzugt einen schwach sauren bis neutralen Standort). Es sollte nun untersucht werden, ob die Entwicklung der Mycorrhiza vom pH-Wert der Lösung abhängig ist und wie darüber hinaus die bei Änderung der Acidität verschieden stark wachsenden Pflanzen vom Endophyten beeinflußt werden. Die Entwicklung mycorrhizahaltiger und mycorrhiza-freier Pflanzen wurde in Knopscher Nährlösung miteinander verglichen.

600 ml Bechergläser, die mit Stanniolpapier lichtdicht umkleidet waren, wurden mit 550 ml Knopscher Nährlösung, die 0,1% Hoagland A-Z-Lösung enthielt, gefüllt. Der Rest wurde mit aqua bidest. aufgefüllt. Die verschiedenen pH-Werte wurden mit 1/10 n HCl und 1/10 n NaOH eingestellt, jeden zweiten Tag geprüft und, soweit erforderlich, justiert. Die Lösungen wurden täglich 15 min durchlüftet. Versuchszeit: 11. 11.—9. 12. 1954.

a) Verpilzungsverlauf. Schon nach 7 Tagen hatte sich die Mycorrhiza in allen pH-Abstufungen ausgebreitet. Bei pH 7 wurde die beste Verpilzung, bei pH 5 und pH 4 eine schlechtere gefunden. Bei pH 4 war eine außerordentlich starke Granulierung des Pilzplasmas und eine äußerst intensive Verdauung des Pilzes zu beobachten. Bei pH 5 und pH 7 setzte die Verdauung erst eine Woche später ein.

Bei allen pH-Stufen waren nicht nur die infizierten Hauptwurzeln, sondern auch die Nebenwurzeln verpilzt. Diese Verpilzung der Nebenwurzeln kann einmal durch Ausbreitung des Endophyten innerhalb der Wurzel erfolgt sein, andererseits aber sprechen die zahlreichen Außenhyphen an den Nebenwurzeln dafür, daß der Pilz aus dem implantierten Stück oder aus der Hauptwurzel ausgewachsen war.

b) Entwicklungsbeeinflussung. 1. Die Entwicklung aller Pflanzen war abhängig vom pH-Wert der Lösung und zwar wurde die beste bei

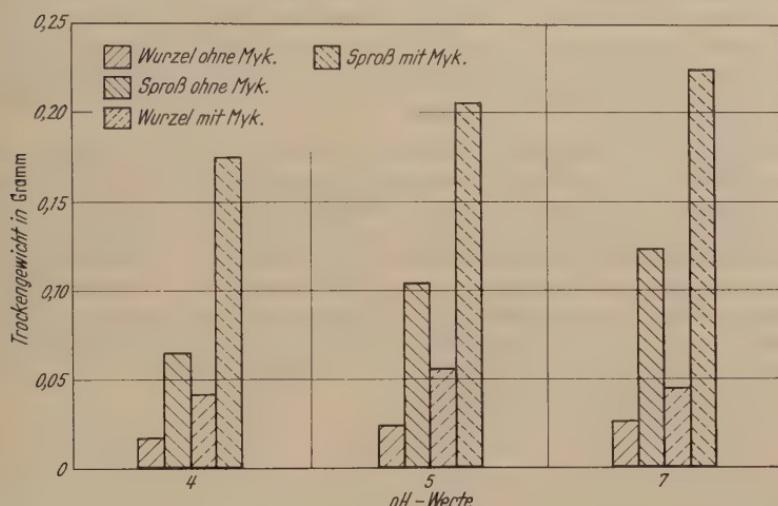


Abb. 22. Die Entwicklung mycorrhizahaltiger und mycorrhizafreier Tabakpflanzen in Nährösungen von verschiedenem pH

pH 7, die schlechteste bei pH 4 gefunden (siehe Abb. 22). Die Entwicklungssteigerung von pH 4 auf pH 7 war jedoch bei verpilzten und unverpilzten Pflanzen verschieden stark. Sie betrug bei den oberirdischen Teilen für die Pflanzen ohne Mycorrhiza 83%, für die Pflanzen mit Mycorrhiza dagegen nur 28%.

2. In allen pH-Stufen wuchsen die mycorrhizahaltigen Pflanzen besser als die pilzfreien. Die Förderung bei den einzelnen pH-Stufen war unterschiedlich stark. Bei der höchsten Wasserstoffionenkonzentration (pH 4) war das Sproßgewicht der mycorrhizahaltigen Pflanzen um 160%, bei der niedrigsten (pH 7) noch um 82% höher als das der unverpilzten bei gleichen pH-Werten. Der Tabak ohne Mycorrhiza hatte bei pH 7, also der Wasserstoffionenkonzentration, bei der er am besten wuchs, ein um 30% geringeres Sproßgewicht als die Pflanzen mit Mycorrhiza bei der höchsten Wasserstoffionenkonzentration (pH 4).

In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Bodenversuchen zeigen auch diese Untersuchungen, daß die Mycorrhiza das Wachstum der jungen

Tabakpflanzen fördernd beeinflußt. Besonders deutlich wird diese Wirkung, wenn die Wachstumsbedingungen der Wirtspflanze schlechter werden. So wird bei hoher Wasserstoffionenkonzentration eine mycorrhizahaltige Pflanze weniger geschädigt als eine mycorrhizafreie.

b) Mangellösungen

Aus den vorstehenden Untersuchungen ergaben sich keine Hinweise dafür, daß der Pilz durch Nährstoffvermittlung das bessere Wachstum auslöste. In den Düngerversuchen waren nun aber die Hauptnährstoffe (N, P, K) immer gemeinsam und im gleichen Verhältnis zugesetzt worden, so daß eine mögliche spezifische Bedeutung einzelner Nährstoffe für das Pilz-Wirt-Verhältnis nicht sichtbar werden konnte. In Versuchen mit Mangellösungen, wobei die Hauptnährstoffe N und P abgestuft den Lösungen zugegeben wurden, sollte geprüft werden, ob bestimmte Nährstoffkombinationen die Mycorrhizaausbildung in der Wurzel und dann auch die Wirkung des Pilzes beeinflussen.

Die Verpilzung der Pflanzen in den Mangellösungen war äußerst gering. Sie betrug im Höchstfalle 7%. Die Pflanzenentwicklung war lediglich von der Nährstoffkonzentration der Lösungen abhängig: Je weniger Nährstoffe sie enthielten, um so schlechter wuchsen die Pflanzen. Der fehlende Einfluß der Mycorrhiza auf das Pflanzenwachstum erklärt sich aus dem geringen Verpilzungsgrad. Schließlich ist nur eine Interferenz des Endophyten zu erwarten, wenn er sich genügend stark innerhalb des Wirtes entwickelt hat. Es scheint fraglich, ob so überhaupt die Ursache der fördernden Wirkung des Pilzes auf das Wachstum der Tabakpflanze geklärt werden kann, weil die Herabsetzung eines Nährstoffes ins Minimum Wirtspflanze und Pilz gleichermaßen beeinträchtigt.

C. Diskussion

Die Entwicklung des Pilzes im Boden, die sowohl durch auskeimende Vesikel als auch durch auswachsendes Mycel eingeleitet werden kann, ist an die Anwesenheit lebender Tabakwurzeln gebunden. Dabei muß allerdings offen bleiben, ob diese „saprophytische Phase“ des Pilzes nur durch Reize einer intakten Wurzel induziert werden kann. Die Klärung dieser Frage wäre sehr aufschlußreich und würde erkennen lassen, ob die spezifischen Ansprüche des Pilzes nur in der Wirtspflanze bzw. durch deren Ausscheidungen befriedigt werden können oder ob dem Pilz schon das Zusammenspiel von anderen belebten und unbelebten Faktoren im Boden die erforderlichen Entwicklungsbedingungen schaffen kann.

Die Unterscheidung einer „saprophytischen“ und „parasitischen“ Phase erscheint auch deshalb wichtig, weil Außenfaktoren sowohl die eine als auch die andere Phase, und zwar unter Umständen gegensätzlich beeinflussen können. Der Torf hemmt die „saprophytische“ Entwicklung und verzögert so den Infektionsbeginn. Bei Fichtenstreuzusatz dagegen ist eine eindeutige Förderung einer bestimmten Phase nicht ersichtlich, wenn auch die höhere Endverpilzung vermuten läßt, daß hauptsächlich die „parasitische“ Phase stimuliert wurde.

Die „parasitische Phase“, die die Entwicklung des Pilzes innerhalb der Wurzel umfaßt, wird weitgehend vom Zustand der Pflanze bestimmt. Je

besser die Pflanze assimilieren kann, je mehr Assimilationsprodukte gespeichert werden, umso kräftiger entwickelte sich das Mycel innerhalb der Wurzel. Alle Faktoren also, die die Assimilation fördern, werden auch einen stimulierenden Einfluß auf die Mycelentwicklung nehmen. Zu gleichen Ergebnissen gelangten ZABLOCKA (1936) und PEYRONEL (1949) bei ihren Untersuchungen über die endotrophe Mycorrhiza bei der Gattung *Viola* bzw. bei *Viola biflora* und *Oxalis acetosella*.

In diesem Zusammenhang können auch die Ergebnisse von BJÖRCKMAN (1942) erwähnt werden, der für die ektotrophe *Pinus*-Mycorrhiza einen Zusammenhang zwischen Assimilation und Verpilzung bei geringer Assimilationsleistung gefunden hat. Für die Pilzausbreitung ist also ein gewisses Minimum an Assimilationsprodukten unbedingt erforderlich. Ist der zur Ernährung des Pilzes notwendige Überschuß erst vorhanden, so führt ein weiterer Anstieg der Nährstoffkonzentration zu keiner weiteren Veränderung des Mycorrhizabefalls. Der Nährstoffgehalt kann somit in bestimmtem Umfange die Wirtseignung (GÄUMANN 1946) der Zellen und Gewebe verändern, was sowohl für die ektotrophe als auch für die endotrophe Mycorrhiza zutrifft.

Die Mycorrhizainfektion und die Pilzausbreitung werden also weitgehend von ökologischen Faktoren beeinflußt. Auf diese Abhängigkeit wiesen schon STAHL (1900) und PEYRONEL (1924) hin. Ihre Befunde allerdings, daß die Mycorrhiza vornehmlich auf nährstoffarmem Boden auftrate, dürfen nicht ohne weiteres verallgemeinert werden (WINTER 1951, SIEVERS 1953) und trifft auf keinen Fall für die Tabakmycorrhiza zu. Sie ist vom Nährstoffhaushalt des Substrates weitgehend unabhängig. Erst bei extremem Nährstoffmangel, der keine auch nur annähernd normale Entwicklung der Wirtspflanze mehr zuläßt, wird auch der Pilz geschädigt.

Ein Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration des Bodens auf die Verpilzung wurde nicht festgestellt. Bei künstlicher Infektion wurde auch bei niedrigem pH-Wert (pH 4) eine gute, wenn auch morphologisch veränderte Verpilzung gefunden.

Die von SCHLICHT (1889) aufgestellte Humustheorie wird durch die vorliegenden Untersuchungen in ein ganz anderes Licht gerückt. Zwar kann die Mycorrhizainfektion und -ausbreitung durch organische Substanzen des Bodens beeinflußt werden, doch zeigen die Wasserkulturversuche und die Versuche mit Untergrundboden, daß diese Stoffe nicht zur normalen Ausbildung der endotrophen Mycorrhiza notwendig sind. Die endotrophe Mycorrhiza ist also auf keinen Fall allein als humusübertragendes Organ für die Wirtspflanze von Bedeutung.

Die STAHLSCHE Theorie, daß die Mycorrhiza im wesentlichen an nährstoffarme Standorte gebunden sei und daß der Pilz Salze für die Wirtspflanze sammle, trifft sicherlich für die ektotrophe Baummycorrhiza zu.

Bei der endotrophen phycomycetoiden Mycorrhiza dagegen macht, wie WINTER (1951) betonte, die geringere Mycelverbindung zum Boden eine direkte Nährsalzübertragung von vornherein unwahrscheinlich. Dabei bleibt allerdings die Frage offen, ob nicht die Besiedlung der Wurzel durch den Pilz in bestimmtem Umfange eine physiologische Veränderung der Wurzel nach sich zieht. Die Versuche mit gedüngtem Untergrundboden, in denen die mycorrhizafreien Pflanzen auch bei optimaler Nährstoffgabe nie das Wachstum der mycorrhizahaltigen erreichten (siehe S. 135), geben vielleicht Anhaltspunkte für diese Annahme. Der Vorteil, den die verpilzte Pflanze aus der Veränderung zieht, läßt sich durch keine Düngergaben angleichen, es muß sich also dabei um eine spezifische Wirkung der endotrophen Mycorrhiza handeln.

Die Förderung der Jugendentwicklung der Tabakpflanze durch die Mycorrhiza wurde in verschiedenen Böden und in der Wasserkultur gefunden. Diese Stimulierung wird besonders deutlich, wenn die Pflanzen unter ungünstigen Bedingungen wachsen. Auf natürliche Verhältnisse übertragen würde das bedeuten, daß die Pflanze sich durch die Mycorrhiza schlechteren Umweltfaktoren besser anzupassen vermag und daß die ökologische Breite erweitert würde.

Der fördernde Einfluß der Mycorrhiza auf die Pflanzenentwicklung wird selbstverständlich durch die allgemeinen Wachstumsgesetze begrenzt. Er kann sich auf der einen Seite nur auswirken, wenn andere Wachstumselemente nicht so weit im Minimum sind, daß eine annähernd normale Pflanzenentwicklung nicht mehr möglich ist. Wenn andererseits der Pflanze bessere Bedingungen geboten werden, wird der stimulierende Einfluß der Mycorrhiza geringer.

Wenn man die Frage nach der Bedeutung der endotrophen Mycorrhiza für die höhere Pflanze stellt, so wird man zu berücksichtigen haben, daß das Anfangsstadium dieser Pflanze-Pilz-Verbindung sicherlich ein echter Parasitismus ist. Wie sich dieses Zusammenleben weiter gestaltet, ob es bei dieser Dyssymbiose bleibt oder ob es zu einer Eusymbiose (SCHAEDE 1948) kommt, kann wahrscheinlich nur von Pflanzenart zu Pflanzenart entschieden werden. Bei der Mycorrhiza des Tabaks handelt es sich auf keinen Fall um einen Parasitismus, denn beide, Wirt und Pilz, ziehen Nutzen aus ihrem Zusammenleben.

D. Zusammenfassung

1. In der Wurzel von *Nicotiana tabacum* wird die endotrophe Mycorrhiza durch einen unseptierten Pilz gebildet. Unter typischer Knäuelbildung wird die Epidermiszelle infiziert, und die ganze primäre Rinde kann mit Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln angefüllt sein.

2. Die Infektion des Tabaks mit der endotrophen Mycorrhiza kann einmal durch Auswachsen von Pilzmycel aus Wurzelresten, zum anderen auch durch Vesikel erfolgen.

3. Es wurde eine Infektionsmethode (Implantation) entwickelt, die einen Vergleich mycorrhizahaltiger und mycorrhizafreier Pflanzen gestattet. Mit Hilfe dieser Methode ist auch die Infektion in Wasserkultur wachsender Pflanzen möglich.

4. Die Ausbreitung des Endophyten innerhalb der Wurzel ist vom Pflanzenzustand, insbesondere der Assimilationsleistung des Wirtes weitgehend abhängig.

5. Durch verschiedene große Torf- und Fichtenstreubeimischungen zu einem sandigen Lehmboden wurden Modellböden hergestellt, in denen der Verpilzungsverlauf verfolgt wurde: In torfhaltigen Böden war die Infektion verzögert, während die Fichtenstreugemische in bestimmten Konzentrationen einen fördernden Einfluß auf die Mycorrhizaentwicklung hatten. Die gleichen Ergebnisse wurden mit Zusätzen von wässrigen Torf- bzw. Fichtenstreuextrakten zum Boden erhalten.

6. Eine Mycorrhizainfektion der Pflanze unter sterilen Bedingungen ist nicht gelungen.

7. Mycorrhizahaltige Tabakpflanzen entwickeln sich besser als mycorrhizafreie.

8. Durch verschiedene große Düngergaben zu nährstoffarmem Boden konnte das Wachstum mycorrhizafreier Pflanzen nicht an das der mycorrhizahaltigen angeglichen werden. Es ergaben sich keine Hinweise dafür, daß der fördernde Einfluß der Mycorrhiza auf einer erhöhten Nährsalzaufnahme beruht.

9. In der Wasserkultur mit verschiedener Acidität wurde immer der fördernde Einfluß der Mycorrhiza sichtbar. Die relative Förderung war bei hoher Wasserstoffionenkonzentration ($p_{\text{H}} 4$) am größten.

10. Bei Pflanzen, die in Mangellsungen wachsen, wird sowohl die Pilzausbreitung als auch die Pflanzenentwicklung gehemmt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. A. G. WINTER, danke ich besonders für die Überlassung des Themas und für das Interesse und die Förderung, die er meiner Arbeit angediehen ließ.

Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten des Landes Nordrhein-Westfalen unterstützt.

Literatur

ASAI, T.: Jap. J. of Bot. **7**, 107 (1934).

BERNARD, N.: Ann. des Sci. natur. Bot. Ser. IX, **14**, 235 (1911). — BIRGEL, G.: Untersuchungen über die Verbreitung, Ökologie und funktionelle Bedeutung der endotrophen Mycorrhiza bei gärtnerischen Kulturpflanzen. Dissertation Bonn (1953). — BJÖRKMAN, E.: Symbolae Bot. Upsalienses **6**, 1 (1942). — BLANCHARD, F. A.: Amer. J. Bot. **38**, 111 (1951). — BOUWENS, H.: Zbl. Bakter. II Orig. **97**, 34 (1937). — BRIAN, P.: Nature (Lond.) **167**, 347 (1951). — BURGEFF, H.: Mycorrhiza (Manual of Pteridology). The Hague (1951). — BURGESS, A.: New Phytologist **35**, 117 (1936). — BUSICH, E.: Vhdls. K. K. zool. bot. Ges. **63**, Wien 1913. — BUTLER, E. J.: Trans. Brit. Mycol. Soc. **12**, 274 (1939).

- DEMETER, K.: Flora (Jena) **116**, 405 (1923).
- ENDRIGKET, A.: Bot. Archiv **39**, 1 (1937).
- FLAIG, W.: Landwirtsch. Forschung **4**, 72 (1953); zit. bei NIGGEMANN.
- GALLAUD, J.: Rev. gén. Bot. **17**, 1 (1905). — GASS, E.: Medd. Stat. Skogsförsökanst. **29**, 587 (1937). — GÄUMANN, E.: Pflanzliche Infektionslehre. Basel: Birkhäuser 1946, S. 318.
- HARLEY, J. L., and E. McCREADY: New Phytologist **55**, 56 (1956). — HARRISON, W.: Nature (Lond.) **175**, 432 (1955). — HILDEBRANDT, A. C.: Amer. J. Bot. **33**, 591 (1946).
- JANSE, J. M.: Ann. Jard. Bot. Buitenzorg **14**, 53 (1897).
- KOCH, L. W.: Canad. J. Res. **13C**, 174 (1935). — KRAMER, P., and K. WILBUR: Science (Lancaster, Pa.) **110**, 8 (1949).
- LIHNELL, D.: Symbolae bot. Upsalienses **3**, 3 (1939).
- MCLENNAN, E. J.: Ann. of Bot. **40**, 43 (1926). — MAGROU, J.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **203**, 887 (1936); **208**, 923 (1939). — MELIN, E.: Symbolae bot. Upsalienses **8**, 3 (1946). — MELIN, E., and H. NILSON: Sv. bot. Tidskr. **46**, 281 (1952). — MORITZ, O.: Angew. Bot. **13**, 151 (1931). — MOSSE, B.: Nature (Lond.) **171**, 974 (1953). — Ann. of Bot. **20**, 349 (1956). — MOSTAFA, A.: Ann. of Bot. **2**, 211 (1938).
- NIGGEMANN, J.: Naturwissenschaften **4**, 98 (1955).
- PEYRONEL, B.: Boll. Staz. Pat. veg. Roma **3**, 43 (1922). — Bull. Soc. Mycolog. France **39**, 119 (1923). — Riv. Biol. **5**, 63 (1924). — Luce, humus et micorize. Ref. Biol. Abstr. **1**, 6046 (1949).
- SAMUEL, G.: Trans. Roy. Soc. S. Australia **50**, 245 (1926). — SCHAEDE, R.: Die pflanzlichen Symbiosen. Jena: G. Fischer 1948. — SCHAFFNIT, E.: Z. Pflanzenkrkh. **60**, 434 (1953). — SCHLICHT, A.: Landwirtschaft. Jahrb. **18**, 439 (1889). — SELLI, M.: Untersuchungen über die endotrophe Mycorrhiza bei Nicotiana tabacum. Dissertation Bonn 1955. — SHIBATA, K.: Jahrb. wiss. Bot. **37**, 643 (1902). — SIEVERS, E.: Arch. Mikrobiol. **18**, 289 (1953). — STAHL, E.: Jb. wiss. Bot. **34**, 534 (1900). — STAHL, M.: Planta (Berl.) **37**, 103 (1949). — STEINBERG, R. A.: J. Agric. Research **75**, 733 (1947).
- WINTER, A. G.: Z. Pflanzenkrkh. **49**, 513 (1939); **50**, 113 (1940). — Phytopath. Z. **17**, 421 (1951). — Z. Bot. **40**, 153, (1952). — WINTER, A. G., u. R. VON RÜMCKER: Arch. Mikrobiol. **15**, 72 (1950).
- ZABLOCKA, W.: Bull. in. Acad. polon. BI, **3** (1936).

Untersuchungen über die Biosynthese der Penicillinase

Von

Dozent SVETOSLAV BARDAROV

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. September 1957)

Die Penicillinaseproduktion, als Ergebnis der Lebensfunktion der Bakterienzelle, hängt von deren Stoffwechsel und dem Vorhandensein bestimmter Nährstoffe im Nährboden ab. Infolge dieser Abhängigkeit ist es bei der industriellen Erzeugung der Penicillinase erforderlich, solche Entwicklungsbedingungen für die Mikroorganismen zu schaffen, die zu einer maximalen Produktion führen und gleichzeitig damit bessere Konzentrierungs- und Reinigungsmöglichkeiten bieten. Aus diesen Erwägungen heraus haben wir uns die Aufgabe gestellt, die Biosynthese der Penicillinase in Verbindung mit dem Stoffwechsel der sie produzierenden Mikroorganismen zu klären.

Es wurden zahlreiche Nährböden zur Gewinnung von Penicillinase angegeben (CZEKALOWSKI 1950, LE PAGE 1946, MURAO 1952, VACZI u. URI 1954, POLLOCK u. Mitarb. 1956, u. a.). Da sie meistens Pepton enthalten, ist die Reinigung des Präparats erschwert und die Penicillinaseproduktion unbefriedigend (CZEKALOWSKI, MURAO, BARDAROV u. a.). Daher sind diese Nährböden wenig dazu geeignet, die Biosynthese der Penicillinase zu klären. Aus diesem Grunde haben wir mit synthetischen Nährböden gearbeitet, die diese Nachteile nicht aufweisen.

Zu unseren Versuchen benutzten wir Sotonschen Nährboden, wobei wir aber das Asparagin durch Ammoniumsalze verschiedener Carbonsäuren ersetzten und die Mengenverhältnisse einiger Komponenten änderten. Es wurden ungefähr 35 Nährböden geprüft (Tab. 1), in denen verschiedene Kombinationen der einzelnen Komponenten sowie die Ammoniumsalze verschiedener organischer Säuren (Bernstein-, Malon-, Äpfel-, Citronen-, Wein-, Oxal-, Milch-, Essigsäure und deren Kombinationen) angewendet wurden. Der Grundnährboden enthält: Ammoniumsalz der Carbonsäure 4,00; Glycerin 60,00; Dikaliumphosphat 0,50; Magnesiumsulfat 0,50; Ferroammoniumcitrat 0,05; Wasser 1000,00. Bei einigen Versuchen benutzten wir Nährböden anderer Zusammensetzung zwecks Klärung der Rolle einzelner Komponenten.

Als penicillinasebildender Mikroorganismus wurde der Stamm *Bac. subtilis Ic* gewählt, der sich nicht wesentlich vom klassischen *Bac. subtilis* unterscheidet (langsame Milchpeptonisierung). Bei den Versuchen wurde die Methode der Oberflächenkultivierung in Fehrenbachkolben angewendet. (200—500 ml Nährböden; 1,5—2 cm Schichtdicke.) Die Penicillinase wurde nach der von uns beschriebenen Methode titriert.

Tabelle 1. Zusammensetzung synthetischer Nährböden

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Komponenten	N -									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Bernsteinsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Malonsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Weinsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Oxalsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Äpfelsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Milchsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Essigsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Citronensäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glutaminsäure	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Asparagin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glycerin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Eisen-ammoniumcitrat	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Monokaliumphosphat	—	—	—	—	—	—	0,45	—	0,25	0,25
Dikaliumphosphat	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—	0,5	0,5	0,25
Magnesiumsulfat	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ammoniumphosphat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glucose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaliumchlorid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Dinatriumphosphat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kochsalz	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Äpfelsaures Ammonium	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Citronensaures Ammonium	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pepton	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ammoniumsulfat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Eisensulfat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Zirmsulfat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Mangansulfat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Natriumnitrat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lactose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	37	36	35	34	33	32	31	30	29	28

Diese Versuche (Tab. 2) zeigten, daß für die Herstellung der Penicillinase das Vorhandensein von Pepton nicht unbedingt notwendig ist, wie dies von CZEKALOWSKI (1950) behauptet wird. *Bac. subtilis Ic* zeigt vielmehr in unseren synthetischen Nährböden einen wesentlich höheren Penicillinasetiter als in Peptonnährböden. In Tab. 2 sind die Höchsttiter einiger Nährböden in PzE/ml¹ angegeben.

Tabelle 2. Penicillinase-Höchsttiter einiger Nährböden

Nährboden	Titer PzE/ml						
Nr. 1	30	Nr. 11	50	Nr. 19	280	Nr. 30	330
Nr. 4	10	Nr. 12	0	Nr. 20	190	Nr. 31	10
Nr. 5	10	Nr. 13	20	Nr. 21	140	Nr. 32	180
Nr. 6	200	Nr. 14	10	Nr. 22	70	Nr. 33	260
Nr. 7	130	Nr. 15	170	Nr. 23	90	Nr. 34	260
Nr. 8	0	Nr. 16	210	Nr. 24	330	Nr. 35	1
Nr. 9	20	Nr. 17	230	Nr. 25	330	Nr. 36	0
Nr. 10	10	Nr. 18	230	Nr. 26	330	Nr. B 27	280

Es wird angenommen, daß die Ammoniumsalze der Carbonsäuren einerseits als Kohlenstoffquelle, anderseits als Stickstoffquelle ausgenutzt werden können. Daher verdient der Stoffwechsel der Ammoniumsalze der Carbonsäuren besondere Beachtung.

Bekanntlich wird beim Abbau der Kohlenhydrate (Glucose) verhältnismäßig viel Energie gewonnen. Dieser Abbauprozess der Glucose durchläuft zwei Phasen: die erste, anaerobe Phase zeichnet sich durch mehrere Etappen aus, die mit der Bildung von Brenztraubensäure enden. Sodann kann der Abbau weiterlaufen, indem Äthylalkohol und Milchsäure gebildet werden. Die Phase wird zwar schon durch die Alkoholgärung gekennzeichnet, doch kann ihr Endverlauf, je nach den Bedürfnissen der Zelle und der in ihr vor sich gehenden Gärungsprozesse, verschieden lange dauern.

Die zweite Phase ist mit den aeroben Vorgängen und mit der Oxydation der Brenztraubensäure oder des Acetaldehyds verbunden. Von da an setzt der Krebssche Cyclus ein, der in einer Reihe von Oxydations- und Reduktionsprozessen allmäßlichen Übergangs der Tricarbonsäuren in Dicarbonsäuren und gleichzeitigen Freiwerdens erheblicher Energiemengen besteht.

Mit Rücksicht auf diese Vorgänge versuchten wir, den Carbonsäurestoffwechsel und die Bildung der Penicillinase bei *Bac. subtilis* zu klären. Die Versuche mit (Abb. 1) zeigten, daß die Anwesenheit

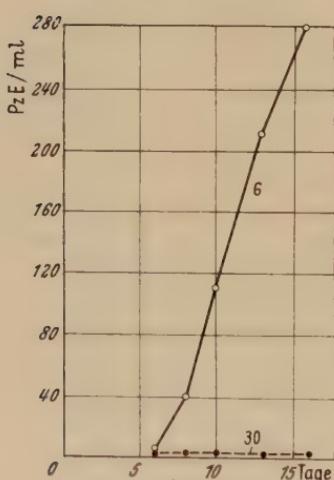


Abb. 1. Penicillinase-Bildung mit (----) und ohne (○—○) Glucose

glucosehaltigen Nährböden

¹ PzE = Penicillinaseeinheit: erforderliche Mindestmenge an Penicillinaselösung zur Zerstörung von 100 IE Penicillin innerhalb 60 min bei 37° C und pH 7,0.

von Glucose in erheblichem Maße die Penicillinasebildung verzögert. Der Mikroorganismus entwickelt sich in glucosehaltigen Nährböden (Nährboden Nr. 12), trotz Anwesenheit von Ammoniumsalzen organischer Säuren, auf dem Kollbengrund ohne Bildung einer Oberflächenhaut und ohne Pigmentbildung. Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, setzt die Penicillinasebildung erst am 16. Tage mit sehr niedrigem Titer (1 PzE/ml) ein; bei Nährböden ohne Glucose (Nährboden Nr. 6) verläuft die Entwicklung dagegen typisch aerob unter Bildung einer festen, stark gekräuselten und stark pigmentierten Oberflächenhaut, wobei die Penicillinasebildung schon am 5. Tage einsetzt und am 16. Tage bereits einen Titer von 280 PzE/ml aufweist.

Ähnliche Ergebnisse wie mit Nährboden 12 werden auch mit Nährboden Nr. 1 erzielt, in dem Pepton als Stickstoffquelle und Glucose als Kohlenstoffquelle dienen.

Diese Ergebnisse sind verständlich, wenn man berücksichtigt, daß die Bakterienzelle, wie unsere Versuche zeigen, die Penicillinase unter aeroben Verhältnissen synthetisiert und daß unter anaeroben Verhältnissen eine Penicillinasebildung nicht stattfindet. Die Glucosespaltung, als anaerober Vorgang während der ersten Phase in den tiefen Schichten der Kultur, führt im Nährboden Nr. 12 wahrscheinlich zur Bildung von Produkten (Brenztraubensäure und Acetaldehyd), aus denen dann die Carbonsäuren entstehen. Sodann ist, unter den nunmehr geschaffenen aeroben Verhältnissen, die Synthese der Penicillinase möglich. In Nährböden, die lediglich Carbonsäuren als Kohlenstoffquelle enthalten, ist die Entwicklung des *Bac. subtilis* sehr verschieden: sie verläuft von Anfang an aerob, und die Penicillinasesynthese ist wesentlich aktiver. Aber auch die verschiedenen Carbonsäuren werden durch *Bac. subtilis* nicht in gleicher Weise ausgenutzt. Die beste Entwicklung und höchsten Titer erreicht man mit Äpfelsäure (Nährböden Nr. 19 und 20). Gute Ergebnisse werden auch bei der Kultur in Nährböden mit Ammoniumsalzen der Malonsäure (Nährboden Nr. 7), Citronensäure (Nr. 30), Milchsäure (Nr. 21), Essigsäure (Nr. 22 und Nr. 23) usw. erzielt. Die schwächste Entwicklung und niedrigsten Titer erhält man in weinsäurehaltigen Nährböden (Tab. 2), da Weinsäure nur von einer unbedeutenden Anzahl von Mikroorganismen als Kohlenstoffquelle genutzt wird (STEPHENSON 1949). Die Ammoniumsalze der Oxalsäure (Nährboden Nr. 17) werden jedoch bei der Biosynthese der Penicillinase durch *Bac. subtilis* verwertet, obwohl die Oxalsäure von den Mikroorganismen nicht als Kohlenstoffquelle genutzt wird (STEPHENSON).

Mit dem Abbau der Kohlenhydrate und der Gewinnung von Energie finden die Stoffwechselvorgänge in der Zelle und die Biosynthese der Penicillinase noch nicht ihren Abschluß. Ebenso wesentlich ist der Stickstoff- bzw. Eiweißstoffwechsel, der in diesem Fall mit dem Kohlen-

stoff-Stoffwechsel eng verbunden sein dürfte, da als Stickstoffquelle einzig und allein die Ammoniumsalze der verwendeten Carbonsäuren genutzt werden.

Da die Bakterienzelle durch Aminisierung der Ketosäuren Aminosäuren zu bilden vermag, so muß die Biosynthese der Penicillinase mit der Aminisierung der Brenztraubensäure zu Alanin, der α -Ketoglutaräure zu Glutaminsäure und der Oxalacetsäure zu Asparaginsäure in Zusammenhang gebracht werden. Diese Auffassung wird durch die Tatsache bestätigt, daß in Nährböden mit Asparagin als Stickstoffquelle (Nährböden Nr. 26, 33 und 34) erheblich höhere Penicillinasetiter erhalten werden (Abb. 2).

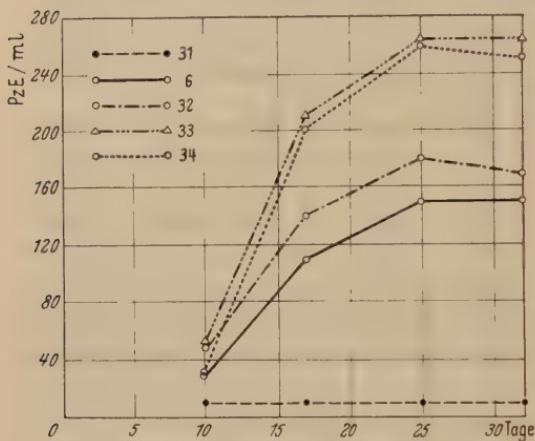


Abb. 2.
Penicillinase-Bildung auf verschiedenen Nährböden

Nr. 32) bis auf 180 PzE/ml ansteigt (Abb. 2). Wir sind der Meinung, daß die Glutaminsäure keine wesentliche Rolle bei der Penicillinasesynthese durch *Bac. subtilis* spielt und daß als Ergebnis des Carbonsäure-Ammoniumsalz-Stoffwechsels Asparaginsäure erhalten wird, die dann am Aufbau der Penicillinase beteiligt ist.

Tabelle 3. Penicillinasebildung bei anorganischen N-Quellen

Tag \ Nährboden	Nr. 6	Nr. 14	Nr. 8	Nr. 5
IV	1	1	0	1
VII	40	10	0	10
X	110	10	0	10
XVII	200	5	0	10
XXI	230	1	0	5

An Hand weiterer Versuche stellten wir fest, daß *Bac. subtilis* nicht alle Arten von Ammoniumsalzen für die Synthese der Aminosäuren verwertet. In einigen Nährböden (Nr. 8, 14 und 5) verwendeten wir anorganische Ammoniumsalze (Ammoniumsulfat und Ammoniumphosphat) als Stickstoffquelle. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse (Tab. 3)

waren in bezug auf die Penicillinase-Bildung äußerst unbefriedigend: der Titer stieg im Nährboden Nr. 14 (mit Ammoniumphosphat) nicht über 10 PzE/ml, während sich der Mikroorganismus im Nährboden Nr. 8 (ebenfalls mit Ammoniumphosphat) überhaupt nicht entwickelte. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir auch bei der Anwendung von Ammoniumsulfat (Nährboden Nr. 5). Dies führt zu der Annahme, daß die organischen Ammoniumsalze vom Typ der verwendeten Carbonsäureammoniumsalze für die Penicillinasesynthese geeigneter sind.

Der Kohlenstoff- und Eiweißstoffwechsel hängt nicht nur vom Vorhandensein organischer Ammoniumsalze und Kohlenstoffverbindungen im Nährboden ab, sondern auch von einer Reihe anderer Stoffe, die mittelbar oder unmittelbar an der Transformation dieser Stoffe in Eiweiß beteiligt sind. In dieser Beziehung dürfte das Ferroammoniumcitrat eine wesentliche Rolle spielen. Die mit Nährböden Nr. 6 (mit Ferroammoniumcitrat) und Nr. 11 (ohne Ferroammoniumcitrat) durchgeführten Versuche weisen erhebliche Unterschiede auf. Zuerst war die Bakterienentwicklung im Nährboden stark verzögert; als sie später auftrat, hatte sie ein körniges Aussehen und ging auf dem Kolbengrund vor sich, ohne Haut- und Pigmentbildung. Nach dem 12.—13. Tage verlief die Entwicklung aerob; es bildete sich an der Oberfläche eine ungleichmäßige Haut mit Warzen und Inseln, und die Flüssigkeit klärte sich fast völlig. Noch später trat eine kaum wahrnehmbare rosa-bräunliche Färbung der Haut ein. Die Penicillinase ließ sich verhältnismäßig spät (am 20. Tage) und in niedrigen Titern (10 PzE/ml) nachweisen. Bis zum 31. Tage stieg der Titer nicht über 50 PzE/ml. Dagegen verlief die Entwicklung im Nährboden Nr. 6 (mit Ferroammoniumcitrat) schon in den ersten 1 bis 2 Tagen aerob, unter Bildung einer zarten, später aber groben, stark gekräuselten und stark pigmentierten Oberflächenhaut, wobei die Flüssigkeit klar blieb. Bereits am 3. Tage betrug der Penicillinasetiter 30 PzE/ml und stieg bis zum 18. Tage auf 110 PzE/ml an (Abb. 3).

Folglich stimuliert das Ferroammoniumcitrat die Pigmentbildung durch die Zelle unter aeroben Entwicklungsbedingungen, während das gebildete Pigment seinerseits wiederum eine wesentliche Rolle bei der Penicillinasesynthese durch den Mikroorganismus spielt. Berücksichtigt man, daß *Bac. subtilis* bei der Züchtung in gewöhnlichen Nährböden

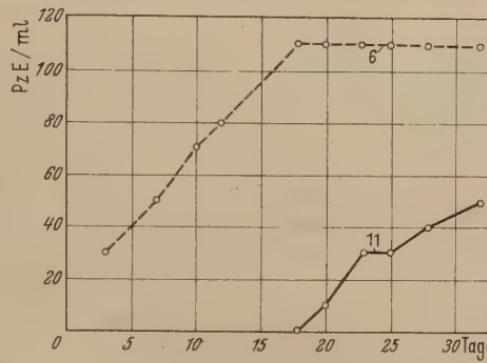


Abb. 3. Wirkung von Ferroammoniumcitrat auf die Bildung der Penicillinase

kein Pigment bildet (BERGEY 1948, KRASILNIKOV 1949, ZION 1948), so ist es durchaus verständlich, daß sich der Stoffwechsel dieses Mikroorganismus in unseren synthetischen Nährböden wesentlich von dem Stoffwechsel bei dessen Züchtung in gewöhnlichen Nährböden unterscheidet.

Die Pigmentbildungsvorgänge sind nicht völlig geklärt. Bekanntlich ist die Pigmentbildung von der Anwesenheit von Mineralsalzen im Nährboden, und zwar in erster Linie von Eisen-, Kupfer-Magnesium- und Phosphorsalzen abhängig. ROBINSON (1932) behauptet, daß Magnesium und Phosphate für die Pigmentbildung

durch *Pseudom. aeruginosa* notwendig seien; Eisen ist ein Bestandteil mancher Atmungsfermente. Folglich dürften Ferroammoniumcitrat, Magnesiumsulfat und Phosphate im Nährboden die Pigmentbildung fördern. Unsere Versuche sind nicht ausreichend, um die Rolle des Pigments bei der Biosynthese der Penicillinase restlos zu klären, doch ausgehend von dem Krebs'schen Cyclus, in dem eine Reihe von Oxydations- und Reduktionsvorgängen in Gegenwart verschiedener Cytochrome,

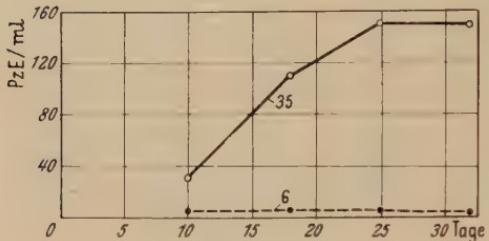


Abb. 4. Wirkung von Magnesium auf die Bildung der Penicillinase

Cytochromoxydinasen, Flavoproteinen und Eisenporphyrinen verwirklicht werden, sind wir der Meinung, daß das gebildete Pigment an den Stoffwechselvorgängen teilnimmt und die Penicillinasesynthese fördert. Welcher Art die Veränderungen sind, die das Pigment bei diesen Vorgängen erfährt, läßt sich allerdings schwer sagen.

Eine wesentliche Rolle spielt bekanntlich auch das Magnesium in einer Reihe von Fermenten, die an den Phosphorylierungs- und Phosphor-Stoffwechselvorgängen in der Zelle beteiligt sind. Die genaue Funktion des Magnesiums konnte aber bis heute nicht geklärt werden. Jedenfalls wird durch die Anwesenheit von Magnesiumsulfat in unseren synthetischen Nährböden die Penicillinasesynthese stimuliert, und es muß daher angenommen werden, daß das Magnesium an der Kette dieser Oxydations- und Reduktionsprozesse beteiligt ist, die zur Penicillinaseproduktion führen. In Nährböden, die kein Magnesiumsulfat enthalten (Nährboden Nr. 35), ist die Penicillinasemenge nur unbedeutend (Abb. 4). Aber auch hier darf dieser Vorgang nicht isoliert betrachtet werden, sondern nur in enger Verbindung mit dem Mineralstoffwechsel als Ganzes und in Sonderheit mit dem Eisen- und Phosphorstoffwechsel.

Die Anwesenheit von Phosphorsalzen (Monokaliumphosphat und Dikaliumphosphat) im Nährboden stimuliert die Penicillinasebildung (Abb. 3).

Bekanntlich treten die Phosphate als Phosphorquelle bei der Eiweiß-Synthese auf. Es wurde mit Sicherheit festgestellt, daß die Phosphate auch an den Oxydationsprozessen teilnehmen, die unter aeroben Verhältnissen vor sich gehen. Beim

Atmungsprozeß bilden sich labile Phosphorverbindungen, die Energie zur Verwirklichung der verschiedenen energetischen Vorgänge (Synthese der Citronensäure, Eiweiße, Fette u. a.) liefern. Bekannt ist die Rolle der Phosphorsalze bei der alkoholischen Gärung oder deren Bedeutung für die energetischen Prozesse bei Muskelkontraktionen usw. LIPMAN (1941) stellt fest, daß *Lactobact. Delbrücki* bei der Oxydation von Brenztraubensäure Acetylphosphat bildet. Ähnliche Erscheinungen beschreiben BARRON u. JACOB (1938) in bezug auf *Strept. haemolyticus*, STADTMAN u. BARKER (1948) bezüglich *Cl. kluyverii* u. a. m. Dabei sind nach HUMMEL u. LINDBERG (1949) zwei Oxydations-Reduktionssysteme — Flavoprotein und Eisenporphyrin — am Phosphorylierungsprozeß beteiligt, die die Übertragung der Elektronen in die eine oder andere Richtung verwirklichen und zwei entgegengesetzte Reaktionen hervorrufen. Folglich muß man hier den Phosphorylierungsprozeß mit der Aufspeicherung von Energie und den Wiederherstellungsprozeß, bei dem große Energiemengen abgegeben werden, mit der Tätigkeit und Mitbeteiligung der Cytochrome und Cytochromoxydasen in Verbindung bringen, d. h. mit dem von der Zelle gebildeten Pigment.

Es bleibt dann noch übrig, die Rolle des Glycerins in der Biosynthese der Penicillinase zu klären. Zu diesem Zweck wurden Versuche durchgeführt mit Nährböden, die verschiedene Mengen Glycerin bzw. kein Glycerin enthielten. Die Ergebnisse sind aus der Abb. 5 zu ersehen. Wie daraus hervorgeht, findet in den Nährböden ohne Glycerin eine bedeutend langsamere Entwicklung von *Bac. subtilis* statt im Vergleich zu den glycerinhaltigen Nährböden, wobei sich auch eine unbedeutende nicht pigmentierte Oberflächenhaut bildet. Der Penicillinasetiter ist ebenfalls unbedeutend und beträgt sogar am 29. Tage vom Beginn der Kultur weniger als 10 PzE/ml. Etwas besser, aber immer noch unbefriedigend, ist die Entwicklung in Nährböden mit 1 oder 2% Glycerin, wobei der Penicillinasetiter nur unwesentlich höher ist. Eine optimale Entwicklung von *Bac. subtilis Ic* und höchste Penicillinasetiter erreicht man in Nährböden mit 4% Glycerin. Bei höheren Glyceringehalten (5 und 6%) fällt der Titer.

Nach WERKMAN u. WILSON (1951) ist zur Bildung einer Oberflächenhaut Grundbedingung, daß die Bakterienzelle an die Oberfläche gedrängt wird. Folglich ist die relative Hydrophobie der Zelloberfläche Voraussetzung zur Bildung einer solchen Haut. Nach LARSON u. LARSON (1932) bilden eine Reihe von Mikroorganismen (*Esch. coli*, *Salm. typhosa*, *Bac. megaterium*, *Staph. aureus* u. a.), die sich in gewöhn-

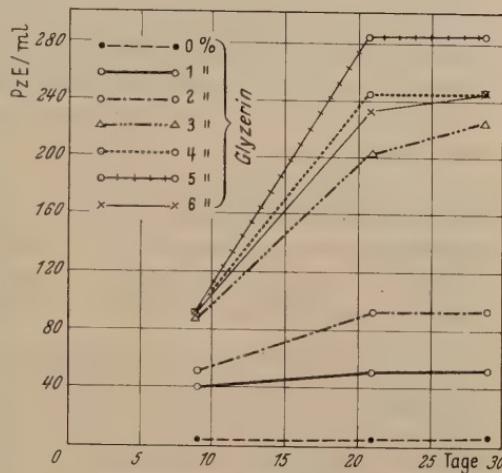


Abb. 5. Wirkung von Glycerin auf die Bildung der Penicillinase

lichen Nährböden sonst diffus entwickeln, bei Zusatz von 3% Glycerin eine üppige Haut an der Oberfläche. Diese Erscheinung erklären die erwähnten Autoren damit, daß das Glycerin an der Synthese der Fette teilnimmt, die sich in der Zelle an die Oberfläche begeben und auf diese Weise deren Hydrophobie steigern. Dies führt zur Verdrängung der Zelle an die Oberfläche, wo sie von der Oberflächenspannung festgehalten wird.

Bekanntlich bildet *Bac. subtilis* auch in gewöhnlichen Nährböden eine gut ausgeprägte Oberflächenhaut. Die Anwesenheit von Glycerin erhöht wahrscheinlich diese Fähigkeit, und dieser Umstand fördert wiederum die aerobe Entwicklung der Kultur und somit die Synthese der Penicillinase, die, wie bereits erwähnt, unter aeroben Verhältnissen stattfindet. Es ist selbstverständlich, daß die Bildung der Oberflächenhaut nicht allein mit dem Glycerin im Nährboden in Zusammenhang gebracht werden darf. Wir erwähnten bereits, daß sich der Mikroorganismus in Gegenwart von Glucose, trotz Anwesenheit von Glycerin im Nährboden, diffus und anaerob entwickelt, wobei auch ein Glucoseabbau vor sich gehen kann. Folglich darf auch dieser Prozeß der Hautbildung auf der Oberfläche nicht isoliert, sondern nur in Verbindung mit dem gesamten Stoffwechsel der Zelle betrachtet werden.

Obwohl unsere Versuche keinen völligen Einblick in den intimen Mechanismus der Biosynthese der Penicillinase durch *Bac. subtilis* vermitteln, so lassen sich doch gewisse allgemeine Schlüsse ziehen, nach denen die Grundbedingungen für die Züchtung der Bakterien sowie der Grundcharakter des Nährbodens bei der Penicillinaseproduktion bestimmt werden können. Auf Grund dieser Versuche haben wir einen neuen synthetischen Nährboden (Nr. 37 in Tab. 1) zusammengestellt, der sich für die Erzeugung hoher Penicillinasesemengen als sehr vorteilhaft erwiesen hat. Außerdem läßt dieser Nährboden infolge seines geringen Gehalts an Eiweißen eine leichte Reinigung des Präparats zu.

Zubereitung des Nährbodens: Die Säuren werden in 100 ml Wasser gelöst und mit Ammoniak bis auf pH 7,2 - 7,4 neutralisiert; danach werden die übrigen Komponenten zugesetzt, die Reaktion des Nährbodens erneut korrigiert und der Nährboden im Autoklav bei 120° C sterilisiert.

Zusammenfassung

Die Penicillinase ist ein Produkt komplizierter Stoffwechselvorgänge und das Ergebnis des Vorhandenseins bestimmter Stoffe im Nährboden. Durch Veränderungen des Kohlenstoff-, Stickstoff- und Mineral-Stoffwechsels in der Zelle wird die Biosynthese der Penicillinase günstig oder ungünstig beeinflußt. *Bac. subtilis* verwertet verhältnismäßig gut die Ammoniumsalze der Carbonsäuren als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle bei der Penicillinasesynthese. Notwendig sind aber auch Eisen-,

Magnesium- und Phosphorsalze. Glycerin fördert die aerobe Entwicklung der Kultur und damit auch die Penicillinasesynthese.

Auf Grund dieser Untersuchungen wird ein neuer synthetischer Nährboden zum Erhalt einer hohen Penicillinaseproduktion vorgeschlagen.

Literatur

- ABRAHAM, E.: Penicillinase, in SUMNER-MYRBÄCK, The enzymes, 1950, S. 1170.
- BARDAROV, S.: „PRIRODA“, **1953**, Heft 6, 26 (bulgarisch). — Moderne Medizin **1954**, Heft 6, 30 (bulgarisch). — Wiss. Arbeiten d. Medicinischen Akademie, **1957**, S. 34. (bulgarisch). — Antibiotika **1957** b, Heft 2, 19 (russisch). — BARRON, S. B., and H. JACOBS: J. Bacter. **36**, 433 (1938). — BERGEY, D. H.: Manual of determinative bacteriology. 6. Aufl. Baltimore: Williams and Wilkins Comp. 1948. — BRODERSEN, R.: Acta path. scand. (Copenh.) **1947**, 24.
- CZEKALOWSKI, J. W.: J. of Path. **62**, 85 (1950).
- HUMMEL, J. P., and O. LINDBERG: J. of Biol. Chem. **180**, 1 (1949).
- KOGUT, M., M. R. POLLOCK and E. J. TRIDGELL: Biochemic. J. **62**, 391 (1956). — KRASSILNIKOV, N. A.: Handbuch zur Bestimmung von Aktinomyzeten und Bakterien, Moskau, 1949 (russ.). — KRETOVIC, V. A.: Grundlagen der Pflanzenbiochemie Moskau, 1952 (russisch).
- LARSON, L. W., and W. P. LARSON: J. Inf. Dis. **51**, 407 (1922). — LIPMANN, F.: Adv. Enzymol. **1**, 99 (1941).
- MARKOV, Wl.: Z. Immun.forsch. **113**, 253 (1956). — MARKOV, Wl., S. BARDAROV, u. E. POPOV: Ber. d. Mikrobiologischen Forschungsinstituts der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften **1954**, Heft 5, 45 (bulgarisch). — J. f. Mikrobiol. Epidemiol. u. Immunol. **1955**, Heft 5, 76 (russisch). — MURAO, S.: J. Amer. Med. Assoc. Heft 3, S. 29 (1952).
- LE PAGE, G. A., J. F. MORGAN and M. E. CAMPBELL: J. of Biol. Chem. **166**, 465 (1946). — POLLOCK, M. R.: J. Gen. Microbiol. **14**, 90 (1956). — POLLOCK, M. A., M. TORRIANI and E. J. TRIDGELL: Biochemic. J. **62**, 387 (1956).
- RAVIC, B.: Antibiotika **1948**, Heft 3, 6 (russisch). — ROBINSON, S.: Brit. J. Exper. Path. **13**, 310 (1932).
- STADTMANN, C. R., and H. A. BARKER: J. of Biol. Chem. **174**, 1039 (1948). — STEPHENSON, M.: Bacterial metabolism. 3. Aufl. London, Longmans, Green a. Co. 1949.
- TODOROV, T., u. A. DUSCHEV: Sammelband d. Wiss. Forschungsinstituts beim Landwirtschaftsministerium Bd. 6, 203 (1956).
- VACZI, L., and J. URI: Acta microb. Academ. Sci. Hung. **2**, 167 (1954).
- WERKMAN, C. H., and P. W. WILSON: Bacterial physiology, New York, Academic Press, 1951.
- ZION, R. A.: Handbuch zur Bestimmung von Bakterien, Moskau 1948 [russisch].

(Aus dem Institut für Pflanzenschutz der Landwirtschaftlichen Hochschule
Hohenheim)

Einfluß der Kulturfiltrate von Mikroorganismen auf die Abgabe von Scopoletin aus den Keimwurzeln des Hafers (*Avena sativa L.*)

Von
PETER MARTIN

(Eingegangen am 16. November 1957)

Die von EBERHARDT (1954, 1955) festgestellte Abgabe von Scopoletin (6-Methoxy-7-oxycumarin) aus den Keimwurzeln des Hafers hat sich im Verlauf weiterer Untersuchungen (MARTIN 1956, 1957) als empfindlicher Maßstab für den physiologischen Zustand der Haferwurzelzellen erwiesen. Es zeigte sich, daß um so mehr Scopoletin aus der Wurzel abgegeben wird, je ungünstiger die abiotischen Faktoren für das Gediehen der Haferkeimlinge sind. Darin dürfte sich eine Schwächung der Vitalität der Zellen äußern, die sich, wenigstens während der Versuchsdauer (maximal 7 Tage), nicht durch eine Hemmung des Wurzelwachstums bemerkbar zu machen braucht und die daher wohl auch reversibler Natur ist. Die meist außerordentlich geringen Scopoletinmengen dürften durch passive Translokation aus der Wurzel in das umgebende Medium gelangen. Weiter konnte festgestellt werden (MARTIN 1957), daß die Anwesenheit von Bakterien in der Kulturflüssigkeit der Haferpflanzen einen erhöhten Scopoletinverlust der Keimwurzeln zur Folge hat. Dieser Befund verbindet das Problem der Abgabe organischer Verbindungen aus den Wurzeln mit den der wechselseitigen Beziehungen von höheren Pflanzen und Mikroorganismen im Boden in ganz besonderer Weise. Er diente daher als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

Methodik

Eine genaue quantitative Erfassung auch sehr geringer Mengen von Scopoletin war durch die außerordentlich starke Fluoreszenzintensität der gelösten Substanz ermöglicht. Für die Berechnung der Absolutwerte des Scopoletins mußten folgende Gegebenheiten berücksichtigt werden: 1. Fluoreszenzwerte des Scopoletins in der Kulturflüssigkeit der Haferpflanzen bei pH 5,4 und pH 9,1 (bestimmt im Spektralphotometer mit Zusatzteilen bei einer Wellenlänge des erregenden Lichts von 366 m μ). 2. pH-Abhängigkeitskurven der Fluoreszenz von Scopoletin, Scopoletin-glykosid und einem weiteren noch nicht näher bekannten fluoreszierenden

Glykosid der Haferwurzel (vgl. GOODWIN u. POLLOCK 1954). 3. Eichkurve von Scopoletin¹.

Die Kultur der Haferkeimlinge erfolgte unter sterilen Bedingungen in Reagensröhren (Länge 16 cm, Ø 1,5 cm), in welche ein Glasrost als Auflage eingefügt war. Die desinfizierten Karyopsen wurden zunächst in sterile Petrischalen eingelegt und nach der Keimung in die Röhren, die bis zur Auflage mit Nährösung nach KNOP angefüllt waren, übertragen.

Bezüglich zahlreicher Einzelheiten der Methode muß auf MARTIN (1957) verwiesen werden. In Anpassung an die vorliegende Versuchsfrage war jedoch folgende Modifizierung des dort beschriebenen Versuchsablaufes notwendig: Die Haferpflanzen wurden zunächst in der üblichen Weise steril kultiviert (3 Pflanzen je Reagensröhren) bis die Wurzeln eine Länge von 3—4 cm erreicht hatten. In diesem Stadium der Entwicklung, das bei einer Temperatur von 25° C 28 Std nach dem Einsetzen der Keimlinge in die Röhren erreicht war, wurde die Nährösung vorsichtig abgegossen und durch die keimfreie Testflüssigkeit ersetzt. Die Flüssigkeit der Kontrollröhren wurde gegen frische sterile Nährösung ausgetauscht (sämtliche Arbeiten unter sterilen Bedingungen). Die Auswertung der Versuche erfolgte 24—28 Std später, eine längere Kultur schien wegen eventueller Wiederaufnahme des Scopoletins (vgl. MARTIN 1957) nicht zweckmäßig. Durch Mikroorganismen verunreinigte Röhren wurden aussortiert. Zu Beginn des eigentlichen Testes wurde die mittlere Ausgangslänge anhand von 30 Pflanzen, die aus dem Versuch genommen wurden, bestimmt. Der festgestellte Wert diente als Grundlage für die Berechnung der Zuwachswerte der Testpflanzen.

Meßeinheit für die Wurzel war die jeweils längste Keimwurzel. Die Berechnung des mittleren Fehlers erfolgte nach der Formel:

$$m = \pm \sqrt{\frac{\sum(f)^2}{n(n-1)}}.$$

Versuchsergebnisse

1. Beeinflussung der Scopoletinabgabe durch Kulturfiltrate von Bakterien

Der für den Test verwendete Bakterienstamm (bewegliche, gramnegative Kurzstäbchen) war aus einem zufällig verunreinigten Haferkulturgefäß eines früheren Sterilversuches gewonnen worden. Als Kulturfüssigkeit für die Bakterien wurde ein Medium von der Zusammensetzung der Knopschen Nährösung mit einem Zusatz von 6 g/l Glucose und 0,6 g/l Asparagin verwendet. Der mit NaOH eingestellte pH-Wert betrug 6,5. Die Entwicklung der Mikroorganismen, die schon bei einem geringen Glucosezusatz in Knopscher Nährösung in Gegenwart der Haferpflanzen recht gut war, blieb in dem genannten Medium ohne Wurzeln offenbar durch das Fehlen abgegebener Wurzelstoffe relativ gering. Nach einer Kulturdauer von 6 Tagen bei 27° C wurde die Kulturfüssigkeit über Membranfiltern entkeimt. Das Filtrat wies eine schwache Fluorescenz auf, deren Intensität bei der Berechnung der Scopoletinwerte abgezogen wurde.

Aus Tab. 1 geht hervor, daß der Stoffverlust der Haferpflanzen durch das Kulturfiltrat der Bakterien ebenso wie durch die unmittelbare Anwesenheit der Organismen in der Nährflüssigkeit der Haferpflanzen (vgl. MARTIN 1957) wesentlich gefördert wird. Die Stoffabgabe der Wurzel

¹ Für die Überlassung einer Probe Scopoletin bin ich Herrn Dr. GORVIN und Herrn Dr. SHARP von den Wellcome Laboratories for Tropical Medicine, London, zu Dank verpflichtet.

wird durch die bakteriellen Stoffwechselprodukte in weit stärkerem Maße beeinflußt als das Längenwachstum. Als abgegebene Substanz war praktisch nur Scopoletin nachzuweisen. Die bei früheren Versuchen (MARTIN 1957) unter anderen Bedingungen außerdem aufgefundenen Verbindungen (Scopoletinglykosid und ein weiteres unbekanntes Glykosid) traten hier nicht merklich in Erscheinung. Durch einen besonderen Versuch konnte gesichert werden, daß die unbewachsene Bakteriennährlösung in der entsprechenden Verdünnung für die Scopoletinabgabe und das Wurzelwachstum während der Testdauer bedeutungslos ist.

Tabelle 1. Einfluß eines Kulturfiltrats von Bakterien auf Scopoletinabgabe und Entwicklung von Haferkeimlingen

4 Wiederholungen je Versuchsglied. 9 Pflanzen je Wiederholung. Testdauer 24 Std. Mittlere Wurzellänge zu Beginn des Testes 30,2 mm, mittlere Coleoptillänge 14 mm

Verhältnis von Bakterienfiltrat zu Nährlösung	γ Scopoletin je Gramm Wurzeltrockengewicht	Zuwachs	
		Wurzel mm	Coleoptile + Mesocotyl mm
reine			
Nährlösung	27,8 ± 1,74	29,8 ± 1,75	25,1 ± 0,83
1 : 8	64,8 ± 3,9	28,5 ± 1,11	27,4 ± 0,29
1 : 3	112,0 ± 5,83	21,5 ± 0,8	27,0 ± 0,1

Wahrscheinlich handelt es sich bei den Bakterienformen, welche die Scopoletinabgabe der Keimwurzeln zu beeinflussen vermögen, um Begleitorganismen von Haferkörnern. Es bestehen nämlich Anhaltspunkte dafür, daß die bakteriellen Infektionen, die wiederholt in Sterilkulturen auftraten, von Keimen ausgingen, die den Haferkörnern an Stellen anhafteten, welche für das Desinfektionsmittel schwer zugänglich waren. Eine solche Verunreinigung führte übrigens nicht in jedem Fall zu einer erhöhten Scopoletinanreicherung im Kulturmedium der Haferpflanzen, eine Erscheinung, die auf die unterschiedlichen physiologischen Fähigkeiten verschiedener Bakterienformen zurückzuführen sein dürfte.

2. Beeinflussung der Scopoletinabgabe durch Kulturfiltrate von Pilzen

a) *Fusarium moniliforme* Shield.

Vorversuche ließen bereits erkennen, daß das Kulturfiltrat von *Fusarium moniliforme*¹ die Scopoletinabgabe von Haferwurzeln wesentlich erhöht. Der Pilz kommt in der Natur an Gramineen, namentlich an Getreide vor und tritt dort zum Teil schädigend auf (WOLLENWEBER u. REINKING 1935).

¹ Aus der Sammlung des Instituts.

Als Kulturmedium für den Pilz war die Nährlösung nach KNOP mit einem Zusatz von 8 g/l Glucose geeignet. Nach 14 tägiger Kulturdauer (25°C) wurde die Flüssigkeit durch Membranfiltration für den Test vorbereitet. Das Filtrat zeigte eine schwach gelbliche Färbung und eine geringe Fluorescenz in ähnlicher Farbe.

Nach Tab. 2 tritt die maximale Scopoletinabgabe bei der Verdünnung 1 : 50 ein. Die geringste der angewendeten Konzentrationen (1 : 500) führt noch zu einer deutlichen Erhöhung der Scopoletinwerte. Bei dieser Konzentration wie auch bei der nächst höheren ist das Längenwachstum

Tabelle 2. Einfluß des Kulturfiltrats von *Fusarium moniliforme*
auf Scopoletinabgabe und Entwicklung von Haferkeimlingen

4—6 Wiederholungen (je 9 Pflanzen) je Versuchsglied. Testdauer 25 Std. Mittlere Wurzellänge zu Beginn des Testes 35,4 mm, mittlere Coleoptillänge 14,6 mm

Verhältnis von Pilzfiltrat zu Nährösung	γ Scopoletin je Gramm Wurzel trockengewicht	Zuwachs	
		Wurzel mm	Coleoptile + Mesocotyl mm
reine Nährösung	26,4 \pm 1,18	27,3 \pm 1,11	23,5 \pm 0,49
1 : 500	34,0 \pm 1,2	27,3 \pm 0,98	23,4 \pm 0,62
1 : 100	87,5 \pm 4,69	28,6 \pm 1,09	24,0 \pm 0,34
1 : 50	110,0 \pm 3,48	24,7 \pm 1,15	23,4 \pm 0,37
1 : 10	96,3 \pm 8,3	4,9 \pm 0,8	20,0 \pm 0,25
1 : 5	14,0 \pm 0,92	0,4 \pm 0,9	16,0 \pm 0,76

der Wurzel während der Versuchsdauer nicht beeinflußt. Die Einwirkung der pilzlichen Stoffwechselprodukte kommt also auch hier durch die abgegebene Scopoletinmenge viel stärker zum Ausdruck als durch die Hemmung des Wurzelwachstums. Die Abgabe bei der stärksten Konzentration (Verdünnung 1 : 5) ist bei praktisch völliger Wachstumshemmung der Wurzel vermindert. Sowohl die gewonnenen Meßwerte als auch ergänzende papierchromatographische Untersuchungen ließen erkennen, daß die Fluorescenz des Wurzelwassers praktisch nur auf Scopoletin zurückzuführen ist.

Eine Abgabe weiterer Substanzen kann auf Grund photometrischer Messungen in Anlehnung an die Methode von STENLID (1948) vermutet werden: In Knopsche Nährösung mit einem Zusatz des Kulturfiltrats von *Fusarium moniliforme* im Verhältnis 1 : 50 wurden abgetrennte Wurzeln $3\frac{1}{2}$ Tage alter Pflanzen eingelegt (Wurzellänge etwa 7 cm). Bei der nach 5 Std vorgenommenen Messung waren unter Berücksichtigung der abgegebenen Scopoletinmenge die Extinktionswerte für die Flüssigkeit mit dem Zusatz des Pilzfiltrats etwas höher als für die Nährösung ohne diesen Zusatz (gemessen gegen die jeweilige Ausgangslösung). Dem Ergebnis kommt jedoch keine große Sicherheit zu infolge der mit der geringen Konzentration der abgegebenen Stoffe verbundenen starken Streuung der Werte und der Verwendung abgeschnittener Wurzeln.

Die verstärkte Abgabe von Scopoletin unter dem Einfluß der pilzlichen Stoffwechselprodukte könnte einmal auf einer Erhöhung des Scopoletinspiegels in der Wurzel, zum anderen auf einem erleichterten Austritt

der Substanz aus der Zelle beruhen. Im Zusammenhang mit der ersten Möglichkeit sei erwähnt, daß BEST (1936, 1944) und MAYER (1956) innekrotischem Blattgewebe von Tabak eine gewisse Scopoletinanreicherung feststellen konnten; ANDREAE u. ANDREAE (1949) beobachteten eine Erhöhung des Scopoletingehalts in virösen Kartoffelknollen. Um über diesen Punkt der Einwirkung der pilzlichen Stoffwechselprodukte auf die Haferwurzel eine Aussage machen zu können, wurde die Scopoletinmenge in beeinflußten und unbeeinflußten Wurzeln quantitativ untersucht.

Wurzeln von Pflanzen, die in der üblichen Weise kultiviert worden waren (Verdünnung 1 : 100 und Kontrolle), wurden 72 Std bei Zimmertemperatur mit Aceton extrahiert (7 Parallelen mit je 12 Pflanzen für jedes Versuchsglied). Das Scopoletin wurde über die papierchromatographische Entwicklung des Extraktes isoliert und nach Eluieren die Fluoreszenzintensität in Wasser bei pH 9,1 gemessen.

Eine Differenz im Scopoletingehalt beeinflußter und nicht beeinflußter Wurzeln konnte nicht festgestellt werden. Die Scopoletinmenge in der Wurzel war auch hier in Übereinstimmung mit den früheren Werten (MARTIN 1957) sehr gering. Sie konnte mit 25 γ, bezogen auf 1 Gramm Trockensubstanz der extrahierten Wurzelmasse, bestimmt werden; die abgegebene Menge der Kontrollpflanzen betrug während der Testdauer 41 γ und die der beeinflußten Pflanzen 97 γ. Daraus ergibt sich, daß die Scopoletinmenge im Kulturmedium diejenige in der Wurzel selbst übertrifft, auch dann, wenn ein größerer Substanzerlust während der Aufbereitung des Extrakts in Rechnung gestellt wird.

Wenn auch eine Scopoletinanreicherung in der Wurzel durch die Einwirkung des pilzlichen Filtrats nicht eintritt, so wird gleichwohl die Scopoletinproduktion der Zellen stark gefördert. Diese Erscheinung könnte aus dem Bestreben der Pflanze verstanden werden, das ausdiffundierende Scopoletin zu ersetzen und wäre dann als Folge einer eingetretenen Gleichgewichtsverschiebung aufzufassen. Das würde aber voraussetzen, daß die pilzlichen Stoffe in einer Weise auf die Pflanze einwirken, welche den Austritt des Scopoletins aus der Zelle begünstigt.

Einwirkungen pilzlicher Toxine auf die osmotischen Eigenschaften der Plasmamembran wurden schon verschiedentlich beschrieben. Nach der von GÄUMANN u. JAAG (1946, 1947) aufgestellten Theorie über das Zustandekommen der irreversiblen toxigenen Welke bei Tomaten ist die primäre Ursache dieser Erscheinung in einer Schädigung der Permeabilität der Plasmagrenzschichten zu suchen (vgl. auch LINSKENS 1955). Fusarinsäure, Enniatin A, Patulin, Penicillsäure, Streptomycin und Aureomycin schädigen die Permeabilität der Protoplasten schon in geringen Konzentrationen und werden deshalb als spezifische Osmosegifte bezeichnet (GÄUMANN, NAEF-ROTH, REUSSER u. AMANN 1952).

Im Hinblick auf die mögliche Wirkungsweise der physiologisch aktiven Substanzen im Filtrat von *Fusarium moniliforme* verdienen aber auch die Untersuchungen von BACHMANN (1956) besonderes Interesse. Danach ist die Störung der Wasserpermeabilität durch die von *Fusarium lycopersici* Sacc. gebildete Fusarinsäure nicht auf eine Schädigung der osmotischen, sondern der nichtosmotischen Wasseraufnahme zurückzuführen. Nach BOGEN u. FOLLMANN (1955) wird im Zusammenhang mit dem Mechanismus der nichtosmotischen Wasseraufnahme, der vom Funktionieren des Stoffwechsels abhängig ist, ein Wasseranteil in der Zelle auch gegen ein osmotisches Gefälle festgehalten. Dieser Anteil kann durch die Einwirkung von Stoffwechselgiften (Natriumazid) freigesetzt werden.

Auch Anelektrolyte werden zu einem Teil nichtosmotisch aus hyper-tonischen Lösungen aufgenommen (Lit. bei BOGEN 1954). Die nichtosmotische Komponente kann hier ebenfalls durch Stoffwechselgifte ausgeschaltet werden (BOGEN u. FOLLMANN 1955). Es bestehen demnach in der Zelle vielleicht physiologische Mechanismen, die eine aktive Aufnahme organischer Stoffe und ihr Festhalten in der Zelle bewirken. Nach STENLID (1948) löst das auch von BOGEN u. FOLLMANN (1955) sowie BACHMANN (1956) verwendete Atmungsgift Natriumazid mit steigender Konzentration bei gehemmter Atmung eine zunehmende Abgabe nicht näher definierter organischer Verbindungen von abgetrennten Keimwurzeln aus. Natriumazid beeinflußt nach BOGEN u. FOLLMANN (1955) die Permeabilität wahrscheinlich nicht.

Auch die aktiven Stoffwechselprodukte von *Fusarium moniliforme* könnten in Analogie zu der von BACHMANN (1956) festgestellten Störung der wasseraufnehmenden und wasserhaltenden Kräfte durch Fusarinsäure den physiologischen Mechanismus schädigen, der normalerweise den Austritt des Scopoletins aus der Zelle verhindert. Ähnlich wie Natriumazid als Stoffwechselgift die nichtosmotische Aufnahme verschiedener Diosmotica beeinflußt (BOGEN u. FOLLMANN 1955), könnte sich auch die Wirkung der pilzlichen Toxine auf die Abgabe verschiedener Verbindungen erstrecken, sie müßte also für die Scopoletinabgabe nicht spezifisch sein.

Die Beantwortung der Frage, inwieweit die vermehrte Scopoletin-abgabe durch eine solche Störung physiologischer Mechanismen verursacht wird, bzw. inwieweit eine Erhöhung der Permeabilität über eine Änderung der physikalisch-chemischen Struktur der Plasmamembran erfolgt, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

b) *Penicillium expansum*

Als weitere Pilzart wurde *Penicillium expansum* zu den Untersuchungen über die Beeinflussung der Abgabe fluoreszierender Substanzen aus der Haferwurzel herangezogen.

Im Gegensatz zu der vorher geprüften *Fusarium*-Art wird von *Penicillium expansum* der Austritt des Scopoletins nicht erhöht, auch dann nicht, wenn eine deutliche Wachstumsdepression der Wurzel zu verzeichnen ist (Tab. 3). Es ist also hier der bei den bisherigen Versuchen (vgl. auch MARTIN 1957) noch nicht beobachtete Effekt aufgetreten, daß ein negativer Einfluß auf das Wurzelwachstum nicht mit einer erhöhten Abgabe von Scopoletin verbunden ist. Ein enzymatischer Abbau des Scopoletins durch pilzliche Stoffe im Filtrat liegt nicht vor.

Tabelle 3. Einfluß des Kulturfiltrats von *Penicillium expansum* auf Scopoletinabgabe und Entwicklung von Haferkeimlingen

4—5 Wiederholungen (je 9 Pflanzen) je Versuchsglied. Mittlere Wurzellänge zu Beginn des Testes 34,9 mm, mittlere Coleoptillänge 14,8 mm. Testdauer 25 Std

Verhältnis von Pilzfätilrat zu Nährösung	γ Scopoletin je Gramm Wurzeltrockengewicht	Zuwachs	
		Wurzel mm	Coleoptile + Mesocotyl mm
reine Nährösung	25,0 ± 1,25	31,0 ± 0,73	25,3 ± 0,41
1 : 500	26,4 ± 0,95	30,2 ± 0,94	24,3 ± 0,39
1 : 100	27,0 ± 1,03	27,5 ± 0,88	24,1 ± 0,5
1 : 10	15,1 ± 0,49	12,2 ± 0,93	23,3 ± 0,58

Nebenbei sei festgehalten, daß *Penicillium expansum* bei einem 7 mal größeren Trockengewicht der Pilzmasse (bei etwa gleich langer Kulturdauer und gleicher Menge Kulturflüssigkeit) in der Verdünnung 1 : 10 eine geringere Wirkung auf das Wurzelwachstum von Haferpflanzen ausübt als *Fusarium moniliforme* (vgl. Tab. 2 u. 3).

Tabelle 4. Einfluß des Kulturfiltrats eines von Haferkörnern isolierten Pilzes auf Scopoletinabgabe und Entwicklung von Haferkeimlingen

4 Wiederholungen (je 6—9 Pflanzen) je Versuchsglied. Testdauer 24 Std. Mittlere Wurzellänge zu Beginn des Testes 30 mm, mittlere Coleoptillänge 14,2 mm

Verhältnis von Pilzfätilrat zu Nährösung	γ Scopoletin je Gramm Wurzeltrockengewicht	Zuwachs	
		Wurzel mm	Coleoptile + Mesocotyl mm
reine Nährösung	24,1 ± 1,32	24,8 ± 1,07	26,1 ± 0,35
1 : 7	41,3 ± 3,87	18,6 ± 0,88	27,5 ± 0,5
1 : 3	77,3 ± 3,82	15,5 ± 1,32	24,8 ± 0,45

c) Unbekannter Pilz

Auch die Wirkung eines pilzlichen Begleiters der Haferkörner auf die Abgabe von Scopoletin aus den Wurzeln konnte nachgewiesen werden. Der isolierte Pilz trat wiederholt an desinfizierten Haferkörnern auf und entwickelte sich möglicherweise vom Innern der Karyopse her. (Über

Vorkommen von Pilzen in Karyopsen und Samen vgl. NIETHAMMER 1939, MARCUS 1942, SCHWARZ-KRAEPLIN 1947.)

Der Pilz konnte nicht näher bestimmt werden, da er sich auf verschiedenen Nährböden steril verhielt. Die Prüfung seiner Wirksamkeit auf die Permeation des Scopoletins wurde nur mit zwei Verdünnungsstufen des Kulturfiltrats vorgenommen. Der Versuch, dessen Ergebnis in Tab. 4 dargestellt ist, trägt daher mehr orientierenden Charakter. Von den fluoreszierenden Substanzen der Wurzel wird auch hier fast ausschließlich Scopoletin abgegeben. Die durch die toxischen Stoffwechselprodukte dieses Pilzes bewirkte Erhöhung der Scopoletinabgabe ist, gemessen an der Hemmung des Wurzelwachstums, nicht so stark wie die von *Fusarium moniliforme*.

3. Einfluß von Patulin auf die Scopoletinabgabe

Patulin, ein ungesättigtes Lacton, wird von verschiedenen Pilzen u. a. von *Penicillium expansum* gebildet. Es ist ein starkes Plasmagift (Welketoxin), über dessen pflanzenpathogene Eigenschaften u. a. GÄUMANN u. JAAG (1947) sowie GÄUMANN, NAEF-ROTH, REUSSER u. AMANN (1952) berichtet haben. Sein Einfluß auf die Permeabilität des Plasmas und seine Bildung durch *Penicillium expansum* ließen eine Untersuchung der Wirkung dieses Toxins auf die Scopoletinabgabe lohnend erscheinen.

Tabelle 5. Einfluß von Patulin auf Scopoletinabgabe und Entwicklung von Haferkeimlingen

4—5 Wiederholungen (je 9 Pflanzen) je Versuchsglied. Testdauer 25 Std. Mittlere Wurzellänge zu Beginn des Testes 36,2 mm, mittlere Coleoptillänge 14,9 mm

Konzentration Mol/l	γ Scopoletin je Gramm Wurzeltrockengewicht	Zuwachs	
		Wurzel mm	Coleoptile + Mesocotyl mm
reine Nährlösung	32,9 ± 1,39	27,6 ± 1,78	25,1 ± 0,39
10 ⁻⁷	24,7 ± 2,01	29,5 ± 1,05	26,6 ± 0,72
10 ⁻⁶	20,4 ± 1,52	27,9 ± 1,29	26,7 ± 0,49
10 ⁻⁵	5,9 ± 0,56	17,6 ± 1,93	24,2 ± 0,48
10 ⁻⁴	26,9 ± 2,16 ¹	2,5 ± 0,88	18,3 ± 0,4

¹ Der Wert bezieht sich auf die Gesamtheit der abgegebenen fluoreszierenden Substanzen (berechnet nach Scopoletin).

Gemessen an der Verkürzung von Gewebestreifen liegt der Schwellenwert für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften von Tomatenblättern durch Patulin bei $1,3 \cdot 10^{-6}$ molar (GÄUMANN, NAEF-ROTH, REUSSER u. AMANN 1952). Patulin zählt daher zu den ausgesprochenen Osmosegiften. Überraschenderweise äußert sich aber die Wirkung des

Toxins auf Haferwurzeln nicht in einer Zunahme, sondern in einer *Abnahme der Scopoletinabgabe* (Tab. 5). Diese Verminderung ist bei allen geprüften Konzentrationsstufen zu verzeichnen. Eine Hemmung des Wurzel- und Coleoptilenwachstums macht sich bei einer Patulinkonzentration von 10^{-5} mol bemerkbar.

Es ist bekannt, daß die Wirkungsweise des Patulins nicht auf die osmotischen Eigenschaften der Zelle beschränkt ist. Eine weitere Wirkungsmöglichkeit beruht nach MIESCHER (1950) auf der Inaktivierung von SH-Gruppen. Die Ursache für die Hemmung der Scopoletinabgabe dürfte in einem solchen Eingreifen des Patulins in den Stoffwechsel der Zelle zu suchen sein. Es sei in diesem Zusammenhang vermerkt, daß sich nach der rein optischen Beurteilung von Papierchromatogrammen, auf die Heißwasserextrakte beeinflußter und unbeeinflußter Wurzeln aufgetragen worden waren, keine Anhaltspunkte für eine entsprechende Verminderung der Scopoletinmenge in der Wurzel ergaben.

Während bei den Konzentrationsstufen 10^{-5} bis 10^{-7} mol praktisch nur Scopoletin abgegeben wird, ist die Substanz bei der Konzentration 10^{-4} mol trotz der wieder ansteigenden Fluoreszenzintensität des Wurzelwassers kaum mehr vorhanden. Die fast völlige Hemmung des Wurzelwachstums bei dieser Konzentrationsstufe weist auf eine tiefgreifende Schädigung oder ein Absterben der Zellen hin.

Die Tendenz der Abnahme der Scopoletinabgabe mit steigender Konzentration ist dem Patulin und den wirksamen Komponenten im Kulturfiltrat von *Penicillium expansum* gemeinsam. Es kann daher angenommen werden, daß Patulin auch an der Wirkung des Pilzfiltrates auf die Haferwurzeln beteiligt ist.

4. Einfluß von Penicillin auf die Scopoletinabgabe

Die Wirkung von Penicillin auf Keimung und Entwicklung der höheren Pflanzen ist im Vergleich zu der anderer Antibiotica relativ gering (WRIGHT 1951, SCHEFFER u. KLOKE 1954). Die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten von Tomatenblättern werden bis zu einer Konzentration von $1,69 \cdot 10^{-2}$ mol nicht geschädigt (GÄUMANN, NAEF-ROTH, REUSSER u. AMANN 1952).

Auch die Wirkung des Penicillins auf die Abgabe von Scopoletin ist nicht sehr groß (verwendet wurde das Na-Salz des Penicillin G). Sie äußert sich bei einer Konzentration von 10^{-3} mol in einer Erhöhung (Tab. 6). In der Kulturlüssigkeit tritt bei dieser Konzentration praktisch nur Scopoletin auf. Im Gegensatz dazu ist die Verbindung an der gegenüber der Kontrolle erniedrigten Fluoreszenzintensität der Kulturlüssigkeit bei der Konzentration 10^{-2} mol nur in relativ geringem Maße beteiligt. Das Wurzelwachstum ist bei dieser Versuchsstufe fast völlig unterdrückt.

Das Längenwachstum von Coleoptile einschließlich Mesocotyl wird, wie auch bei den vorhergehenden Versuchen, weniger als das der Wurzel gehemmt.

Tabelle 6. Einfluß von Penicillin auf Scopoletinabgabe und Entwicklung von Haferkeimlingen

4—5 Wiederholungen (je 9 Pflanzen) je Versuchsglied. Testdauer 25 Std. Mittlere Wurzellänge zu Beginn des Testes 36,2 mm, mittlere Coleoptillänge 14,9 mm

Konzentration Mol/l	γ Scopoletin je Gramm Wurzeltrockengewicht	Zuwachs	
		Wurzel mm	Coleoptile + Mesocotyl mm
reine Nährlösung	34,0 ± 2,38	25,7 ± 1,66	24,1 ± 0,27
10 ⁻⁵	33,8 ± 0,81	25,3 ± 0,59	24,1 ± 0,39
10 ⁻⁴	38,7 ± 1,19	24,0 ± 1,28	24,2 ± 0,2
10 ⁻³	59,0 ± 3,7	20,3 ± 1,26	23,0 ± 0,38
10 ⁻²	(12,8 ± 1,5) ¹	1,3 ± 0,46	16,3 ± 0,55

¹ Der Wert bezieht sich auf die Gesamtheit der abgegebenen fluoreszierenden Substanzen (berechnet nach Scopoletin). Der Scopoletinanteil beträgt etwa 30 %.

Diskussion

Die Versuche haben gezeigt, daß mikrobielle Stoffwechselprodukte in der Kulturlösigkeit von Haferkeimlingen bezüglich der Abgabe von Scopoletin aus den Wurzeln sehr unterschiedliche Wirkungen hervorrufen können. Während auf der einen Seite die Abgabe des Scopoletins stark gefördert wird (z. B. durch *Fus. moniliforme*), tritt auf der anderen eine deutliche Hemmung ein (z. B. durch Patulin). Die Fähigkeit gewisser Organismen, einen Austritt organischer Stoffe aus der Wurzelzelle zu veranlassen, beansprucht im Hinblick auf die Gemeinschaft von höheren Pflanzen und Mikroorganismen im Boden besonderes Interesse.

Zum Problem der wechselseitigen Beziehungen zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen wurde bereits eine Fülle von Einzelsachen zusammengetragen¹. Den sehr komplexen und schwer erfaßbaren Verhältnissen in der Wurzelzone ist es zuzuschreiben, daß es bisher trotzdem nicht gelungen ist, ein klares Bild dieser Beziehungen zu gewinnen.

Mit der Anreicherung von Bakterien und Pilzen in der Wurzelzone wird häufig eine Ausscheidung organischer Stoffe als normale Funktion lebender Wurzelzellen in Zusammenhang gebracht (z. B. KRASSILNIKOW 1949, ROVIRA 1956). Die Richtigkeit dieser Vorstellung konnte

¹ Einen Überblick über die Literatur bieten: KATZNELSON, LOCHHEAD u. TIMONIN (1948), RIPPEL-BALDES (1955).

jedoch bisher nicht bewiesen werden (vgl. dazu BÖRNER 1956). Zwar liegt nach früheren Befunden (MARTIN 1957) und auch nach denen der vorliegenden Arbeit eine Abgabe organischer Verbindungen von intakten Haferwurzelzellen vor, sie muß aber, nach den entsprechenden Begleitumständen zu schließen, als subtile Reaktion auf die vom Optimum abweichenden Entwicklungsbedingungen für die Haferpflanzen aufgefaßt werden. Es liegt ihr also kein ständiger Lebensprozeß der Zelle zugrunde.

Welche Möglichkeiten bestehen nun für die Erklärung der Rhizosphäre unter Ausschluß der Annahme einer Ausscheidungsfunktion der Wurzelepidermiszellen?

1. Grundsätzliche Bedeutung ist der Tatsache zuzumessen, daß von der Wurzel stets und ständig organisches Material in Form von abgestorbenen Wurzelhaaren, Calyptra- und Corticalzellen usw. freigesetzt wird (vgl. EBERHARDT u. MARTIN 1957).

2. Die Anreicherung von Mikroorganismen an jungem noch wachsendem Wurzelgewebe (STOLP 1952, ROVIRA 1956) kann nach STOLP der Wirkung von Schleimüberzügen um Wurzelspitze und Wurzelhaare (HABERLANDT 1909) zugeschrieben werden. Bei diesbezüglichen Untersuchungen könnten jedoch auch die besonderen Kulturbedingungen für die Versuchspflanzen einen Stoffaustritt aus der Zelle bewirken (vgl. MARTIN 1957).

3. Die Empfindlichkeit der Scopoletinabgabe gegen abiotische Umweltfaktoren weist auf die Möglichkeit eines Stoffverlustes der Zelle hin unter Voraussetzungen, wie sie zum Teil, eventuell nur vorübergehend, im Boden gegeben sein könnten.

4. Die vorliegenden Versuche zur Beeinflussung der Scopoletinabgabe durch mikrobielle Stoffwechselprodukte legen schließlich den Gedanken nahe, daß gewisse Mikroorganismenarten u. a. eine Schädigung der Permeabilitätseigenschaften bzw. eine Reduzierung der substanzhaltenden Kräfte der Protoplasten und damit einen Stoffverlust der Wurzelzelle auszulösen vermögen ohne ein ausgesprochenes Infektionsvermögen zu besitzen.

Es läßt sich noch keinerlei Aussage darüber machen, inwieweit die unter Punkt 4 genannte Wechselwirkung zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen beim Zustandekommen der Rhizosphäre eine Rolle spielt. Auch die Frage nach den Grenzen solcher im Extremfall zweifellos für die höhere Pflanze schädigenden Einflüsse muß weitgehend offen bleiben. Es ist zu erwarten, daß die Entwicklung der betreffenden Mikroorganismenformen durch die Resistenz der höheren Pflanze und durch die antibiotischen Beziehungen in der Rhizosphäre in Schranken gehalten wird. Eine schädigende Wirkung dürfte deshalb örtlich

begrenzt sein und von der Pflanze weitgehend kompensiert werden. Es ist auch in Betracht zu ziehen, daß neben Substanzen, die den Mikroorganismen als Nahrungsquelle dienen, antibiotisch wirksame Verbindungen freigesetzt werden können, mit Hilfe derer sich die Pflanze gegen ein Überhandnehmen der betreffenden Arten wehrt. Bekanntlich konnten antibiotisch wirksame Substanzen in den Wurzeln zahlreicher Pflanzen festgestellt werden (HARRIS 1949, WINTER u. WILLEKE 1951, 1952, METZ 1955).

Ist nun aber das biologische Gleichgewicht im Boden gestört, dann könnte es unter Umständen möglich sein, daß die betreffenden aktiven Mikroorganismenformen starke parasitäre Wirkungen entfalten. SEKERA (1955) konnte im sogenannten „Dunkelkeimversuch“ zeigen, daß eine Störung der Biocönose durch Verarmung der Organismengesellschaft im Boden eine parasitäre Entartung der Rhizosphäre mit sich bringen kann. Es wurde nachgewiesen, daß die dabei zur Entfaltung kommenden parasitären Formen in der artenreichen Organismengesellschaft gesunder Böden unterdrückt werden oder ihren pathogenen Charakter verlieren. Eine Verarmung der Mikroorganismenarten konnte in verschiedenen Ackerböden festgestellt werden. SEKERA sieht in der parasitären Entartung der Rhizosphäre eine allgemeine und weit verbreitete Form der Bodenmüdigkeit. Auch RADEMACHER (1957) unterstreicht die Bedeutung der Mikroflora innerhalb des Gesamtkomplexes der Nachbar- und Folgewirkungen höherer Pflanzen und begründet unsere bisher mangelhaften Kenntnisse mit der Schwierigkeit der Materie.

STILLE (1957) wies anhand der Wirkung von Kulturfiltraten verschiedener Mikroorganismen auf das Reduktionsvermögen von Wurzelzellen für Triphenyltetrazoliumchlorid nach, daß junge Wurzeln außerordentlich empfindlich auf Stoffwechselprodukte sowohl parasitärer als auch nichtparasitärer Bodenorganismen reagieren können.

Diese Befunde stellen zusammen mit den eigenen Ergebnissen die Frage der wechselseitigen Beziehungen von höheren Pflanzen und Mikroorganismen im Hinblick auf die Möglichkeit phytopathologischer Wirkungen der Rhizosphäre mehr als bisher in den Vordergrund.

Zusammenfassung

Die Abgabe von Scopoletin (6 Methoxy-7-oxycumarin) aus den Keimwurzeln steril kultivierter Haferpflanzen in Abhängigkeit von der Wirkung mikrobieller Kulturfiltrate sowie von Patulin und Penicillin wurde quantitativ mit Hilfe fluoreszenzoptischer Methoden untersucht. Ge- messen an der Wachstumshemmung der Wurzel stellt die Scopoletinabgabe ein empfindlicheres Kriterium für die Wirkung gewisser mikrobieller Stoffwechselprodukte dar.

1. Durch den Zusatz der Kulturflüssigkeit einer (nicht näher bestimmten) Bakterienart zur Nährösung der Haferpflanzen tritt eine beträchtliche Vermehrung der Abgabe von Scopoletin aus der Wurzel ein.

2. Ein wesentlich erhöhter Stoffverlust wird auch durch Stoffwechselprodukte von *Fusarium moniliforme* verursacht. Bei einem Verhältnis der zugesetzten Pilzflüssigkeit zur Nährösung der Haferpflanzen von 1 : 100 macht sich während der Versuchsdauer (25 Std) noch keine Hemmung des Wurzelwachstums bemerkbar (Zuwachs 28 mm), dagegen erreicht die abgegebene Scopoletinmenge beinahe den $3\frac{1}{2}$ fachen Wert der Kontrolle. Bei einer Verdünnung von 1 : 500 ist die Fluorescenz der Wurzelflüssigkeit noch deutlich verstärkt. Eine ähnliche Wirkung übt auch das Kulturfiltrat einer weiteren Pilzart aus. Durch die Kulturflüssigkeit von *Penicillium expansum* wird im Gegensatz dazu die Abgabe des Scopoletins auch bei eingetretener Wurzelhemmung nicht erhöht.

3. Patulin hemmt die Scopoletinabgabe noch bei einer Konzentration von 10^{-7} mol. Penicillin verursacht den entgegengesetzten Effekt bei Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-4} mol.

4. Diese Ergebnisse legen den Gedanken nahe, daß die Fähigkeit gewisser Mikroorganismen, einen Stoffverlust der Wurzelzelle auszulösen, für die wechselseitigen Beziehungen zwischen höheren Pflanzen und Mikroorganismen und für das Zustandekommen der Rhizosphäre bedeutungsvoll sein kann.

Herr Professor Dr. B. RADEMACHER danke ich aufrichtig für die Bereitstellung von Arbeitsmöglichkeiten und für sein stetes Interesse an diesen Untersuchungen.

Die Arbeiten wurden in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Literatur

ANDREAE, S. R., and W. A. ANDREAE: The metabolism of scopoletin by healthy and virus infected potato tubers. Canad. J. Res. C **27**, 15—22 (1949).

BACHMANN, E.: Der Einfluß von Fusarinäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. Phytopath. Z. **27**, 255—288 (1956). — BEST, R. J.: Studies on a fluorescent substance present in plants. I. Production of the substance as a result of virus infection and some applications of the phenomenon. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. **14**, 199—213 (1936). — Studies on a fluorescent substance present in plants. II. Isolation of the substance in a pure state and its identification as 6-Methoxy-7-hydroxy-1:2-benzopyrone. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. **22**, 251—255 (1944). — BOGEN, H. J.: Zellphysiologie und Protoplasmistik. Fortschr. Bot. **15**, 212—258 (1954). — BOGEN, H. J., u. G. FOLLMANN: Osmotische und nichtosmotische Stoffaufnahme bei Diatomeen. Planta **45**, 125—146 (1955). — BÖRNER, H.: Die Abgabe organischer Verbindungen aus den Karyopsen, Wurzeln und Ernterückständen von Roggen (*Secale cereale* L.), Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und ihre Bedeutung bei der gegenseitigen Beeinflussung der höheren Pflanzen. Beitr. Biol. Pflanz. **33**, 33—83 (1956).

EBERHARDT, F.: Ausscheidung einer organischen Verbindung aus den Wurzeln des Hafers (*Avena sativa* L.) Naturwissenschaften **41**, 259 (1954). — Über fluores-

zierende Verbindungen in der Wurzel des Hafers. — Ein Beitrag zum Problem der Wurzelausscheidungen. *Z. Bot.* **43**, 405—422 (1955). — EBERHARDT, F., u. P. MARTIN: Das Problem der Wurzelausscheidungen und seine Bedeutung für die gegenseitige Beeinflussung höherer Pflanzen. *Z. Pflanzenkrkh.* **64**, 194—205 (1957).

GÄUMANN, E., u. O. JAAG: Über das Problem der Welkekrankheiten bei Pflanzen. *Experientia* (Basel) **2**, 215—220 (1946). — Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens. I—III. *Ber. schweiz. bot. Ges.* **57**, 3—34, 132—148, 227 bis 241 (1947). — GÄUMANN, E., ST. NAEF-ROTH, P. REUSSEUR u. A. AMANN: Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. *Phytopath. Z.* **19**, 160—220 (1952). — GOODWIN, R. H., and B. M. POLLOCK: Studies on roots. I. Properties and distribution of fluorescent constituents in *Avena* roots. *Amer. J. Bot.* **41**, 516—520 (1954).

HABERLANDT, G.: Physiologische Pflanzenanatomie. Leipzig 1909. — HARRIS, H.A.: Antibacterial activity of seedling extracts of cultivated plants. *Bull. Torrey Bot. Club* **76**, 244—254 (1949).

KATZNELSON, H., A. G. LOCHHEAD and M. J. TIMONIN: Soil microorganisms and the rhizosphere. *Bot. Review* **14**, 543—587 (1948). — KRASSILNIKOW, N. A.: Mikroorganismen des Bodens und der Ertrag der Pflanzen (russisch). *Agrobiologija* **2**, 49—58 (1949).

LINSKENS, H. F.: Der Einfluß der toxigenen Welke auf die Blattausscheidungen der Tomatenpflanze. *Phytopath. Z.* **23**, 89—106 (1955).

MARCUS, O.: Über das Vorkommen von Mikroorganismen in pflanzlichen Geweben. *Arch. Mikrobiol.* **13**, 1—44 (1942). — MARTIN, P.: Qualitative und quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung organischer Verbindungen aus den Keimwurzeln des Hafers (*Avena sativa* L.). *Naturwissenschaften* **43**, 227—228 (1956). — Die Abgabe von organischen Verbindungen, insbesondere von Scopoletin, aus den Keimwurzeln des Hafers. *Z. Bot.* (im Druck) (1957). — MAYER, F.: Untersuchungen zur Wirkungsweise von Trichloracetat (TCA) auf die Pflanze. *Diss. Hohenheim* 1956. — METZ, H.: Untersuchungen über die Rhizosphäre. *Arch. Mikrobiol.* **23**, 297—326 (1955). — MIESCHER, G.: Über die Wirkungsweise von Patulin auf höhere Pflanzen, insbesondere auf *Solanum Lycopersicum* L. *Phytopath. Z.* **16**, 369—397 (1950).

NIETHAMMER, A.: Mikroskopische Bodenpilze als Begleiter in Früchten und Samen. *Arch. Mikrobiol.* **10**, 13—25 (1939).

RADEMACHER, B.: Gegenseitige Beeinflussung höherer Pflanzen. In RUHLAND, W.: Handbuch der Pflanzenphysiologie **11**. Berlin-Göttingen-Heidelberg (im Druck). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955. — ROVIRA, A. D.: Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. I. The nature of root exudate from oats and peas. *Plant a. Soil* (The Hague) **7**, 178—194 (1956). — Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. II. A study of the properties of root exudate and its effect on the growth of micro-organisms isolated from the rhizosphere and control soil. *Plant a. Soil* (The Hague) **7**, 195—207 (1956). — A study of the development of root surface microflora during the initial stages of plant growth. *J. appl. Bact.* **19**, 72—79 (1956).

SCHEFFER, F., u. A. KLOKE: Der Einfluß von Antibiotica auf die Entwicklung und den Nährstoffgehalt von Kulturpflanzen. *Z. Pflanzenernährg.* **66** (111), 29 bis 38 (1954). — SCHWARTZ-KRAEPLIN, H.: Über das Vorkommen eines Pilzhäutchens in den Samen. *Z. Naturforsch.* **2b**, 450—451 (1947). — SEKERA, F.: Der Dunkelkeimversuch als biologische Testmethode. *Z. Pflanzenernährg.* **70** (115), 139—207 (1955). — STENLID, G.: The effect of sodium azide on the exudation and oxygen consumption of excised plant roots. *Physiol. Plant.* **1**, 185—195 (1948). — STILLE, B.:

Schädigungen an Pflanzenwurzeln durch Kulturfiltrate von Mikroorganismen. Arch. Mikrobiol. **26**, 71—82 (1957). — STOLP, H.: Beiträge zur Frage der Beziehungen zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen. Arch. Mikrobiol. **17**, 1—30 (1952).

WINTER, A. G., u. L. WILLEKE: Untersuchungen über Antibiotica aus höheren Pflanzen und ihre Bedeutung für die Bodenmikrobiologie und Pflanzensoziologie. Naturwissenschaften **38**, 262—264 (1951). — Untersuchungen über Antibiotica aus höheren Pflanzen. II. Naturwissenschaften **38**, 354 (1951). — Untersuchungen über Antibiotica aus höheren Pflanzen. III. Leicht flüchtige Hemmstoffe der Ranunculaceen. Naturwissenschaften **38**, 457 (1951). — Untersuchungen über Antibiotica aus höheren Pflanzen. IV. Hemmstoffe im herbstlichen Laub. Naturwissenschaften **39**, 45—46 (1952). — Untersuchungen über Antibiotica aus höheren Pflanzen. V. Hemmstoffe in Blättern und Blattstreu der Gramineen. Naturwissenschaften **39**, 190—191 (1952).

WOLLENWEBER, H. W., u. O. A. REINKING: Die Fusarien. Berlin 1935. — WRIGHT, J. M.: Phytotoxic effects of some antibiotics. Ann. of Bot. **15**, 493—499 (1951).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Untersuchungen über die Zusammensetzung von Bakterienschleimen und deren Lösungsvermögen gegenüber schwerlöslichen anorganischen Verbindungen

Von

D. CLAUS, H. WITTMANN und A. RIPPEL-BALDES*

(Eingegangen am 5. November 1957)

Die vorliegenden Untersuchungen gehen davon aus, daß im Anschluß an die günstige Wirkung geringer Agarmengen auf die Resorption des Eisens RIPPEL (1936) sowie RIPPEL u. Mitarb. (1938) die Vermutung äußerten, daß die Schleimhülle der Bakterien unmittelbar an der Resorption schwerlöslicher anorganischer Stoffe beteiligt sei, zumal die Mikroorganismen im Boden eine typische Aufwuchsflora darstellen. Schon vorher hatte BASSALIK (1912/13) dem Bakterienschleim insofern Bedeutung bei der Lösung von Silikaten beigemessen, als dieser mit Kohlensäure gesättigt und dadurch bei der gleichzeitig festen Umhüllung der Mineralpartikel lösend wirken solle.

NEUBERG u. Mitarb. veröffentlichten mehrere bemerkenswerte Arbeiten über die Löslichkeit und Verwendung von unlöslichen Stoffen in der Natur. Danach haben unter anderem auch die gepaarten Uronsäurederivate ein großes Lösungsvermögen für schwerlösliche anorganische Salze, wie z. B. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ oder CaCO_3 . NEUBERG führte in diesem Zusammenhang den Begriff „Mineralysis“ ein (vgl. MANDL u. NEUBERG 1956).

Alle diese Beobachtungen lassen vermuten, daß nicht allein die im Verlauf des Stoffwechsels der Bakterien gebildeten organischen Säuren und andere Stoffwechselprodukte mit Chelatbildungsvormögen (SCHATZ u. Mitarb. 1954; SCHEFFER u. Mitarb. 1957), sondern auch die Schleime (und diese vielleicht durch ihren Uronsäuregehalt) mit an der Lösung der im Boden befindlichen schwerlöslichen Substanzen beteiligt sind, zumal Carboxylgruppen-tragende Polysaccharide, wie es die Schleime sind, die einzigen „Säuren“ sind, die sich im Boden unter aeroben Bedingungen anreichern.

Eine die Zellmembran umgebende Schleimschicht gehört im allgemeinen zum normalen Aufbau einer Bakterienzelle. Die Dicke dieser

* RICHARD HARDER zum 70. Geburtstage.

Schleimhülle hängt, neben Wachstumsbedingungen, von der Art des Organismus ab.

Die Bakterienschleime sind in der Mehrzahl Polysaccharide, die entweder aus gleichartigen Bausteinen (Glucose:Dextrane, Fructose:Laevane) oder aus einem Gemisch verschiedener Monosaccharide mit Uronsäuren (= Polyuronide) und/oder Hexosamin aufgebaut sind (vgl. die Sammelreferate von STACEY 1946 und EVANS u. HIBBERT 1946). Gelegentlich finden sich als Schleimschicht der Bakterien Polypeptide oder Nucleinsäuren, letztere bislang nur bei halophilen Organismen (SMITHIES u. GIBBONS 1955).

Eingehende Untersuchungen liegen über die chemische Zusammensetzung der Schleime vor. Durch die ausgebauten Methodik war es möglich, neben den in älteren Arbeiten aufgefundenen Glucose- und Fructose-Bausteinen auch andere Monosaccharide sowie Hexosamin und Uronsäuren nachzuweisen. FORSYTH u. WEBLEY (1949) untersuchten die Schleime von über 30 Bodenbakterien und fanden nach Hydrolyse der Polysaccharide neben Glucose und Fructose auch Mannose, Rhamnose, Xylose und Uronsäuren in verschiedener Kombination. DZULYUSKA u. MIKULASZEK (1954) gaben nach Untersuchungen an 180 Stämmen verschiedener Bakterien Glucose, Galaktose, Mannose, Rhamnose, Xylose, Arabinose (diese jedoch nicht bei Eubakterien) und Uronsäuren als Bausteine an. Fucose fanden kürzlich EAGON u. DEDONDER (1955) bei *Pseudomonas* und WILKINSON u. Mitarb. (1955) bei *Aerobacter aerogenes*. Bei der Untersuchung verschiedener *Salmonella*- und *Shigella*-Stämme konnte DAVIES (1955) Glucose, Galaktose und Mannose in den *Salmonella*-Stämmen, und Hexosamin neben Galaktose, Glucose und Rhamnose bei der *Shigella*-Gruppe nachweisen. Das Vorhandensein von Uronsäuren im Schleim verschiedener Cellulosezersetzer haben NORMAN u. BARTHOLOMEW (1940) angegeben.

Über den strukturellen Aufbau der Schleimstoffe — die Verknüpfung der Zucker — liegen bis heute relativ wenig Angaben vor. Sie beziehen sich vor allem auf die Polysaccharide der Pneumokokken und anderer, medizinisch wichtiger Bakterien und haben dort zu bemerkenswerten Erkenntnissen zwischen Struktur und serologischer Spezifität geführt (BURGER 1950). Weiterhin ist die Struktur eines Polysaccharides von *Azotobacter chroococcum*, von *Rhizobium*, *Leuconostoc mesenteroides* und einigen anderen Bakterien bekannt (STACEY 1946, STACEY u. RICKETTS 1952).

Eine quantitative Erfassung der Polysaccharidbausteine erfolgte nur bei wenigen Untersuchungen. Neben den Angaben bei Pneumokokken (BURGER 1950) soll der auf Rohrzucker gebildete Schleim von *Azotobacter chroococcum* 87% Glucose und 3% Uronsäuren enthalten, der einer *Rhizobium*-Art 67% Glucose und 23% Uronsäuren (EVANS u. HIBBERT 1946). Doch konnten DE LEIZOLA u. DEDONDER (1955) bei mehreren *Rhizobium*-Stämmen keine Uronsäuren nachweisen, dagegen neben Glucose auch Galaktose, Rhamnose und Mannose. LAWSON u. STACEY (1954) fanden bei *Azotobacter chroococcum* neben Glucose und Glucuronsäure ebenfalls Galaktose. WILKINSON u. Mitarb. (1955) stellten bei *Aerobacter aerogenes* 50% Glucose, 10% Fucose und 29% Uronsäuren fest. Das Polysaccharid von *Azotobacter indicum* ist nach QUINNELL u. Mitarb. (1957) ein Polymeres der Glucose, Glucuronsäure und einer Aldoheptose im Verhältnis 3 : 2 : 1.

PFENNIG (1958) konnte erstmalig aus dem Kulturfiltrat eines *Streptomyces*-Stammes 2 Schleimfraktionen gewinnen. Fraktion A erwies sich als Polyglucose; in der Fraktion B konnten neben N-haltigen Verbindungen Galaktose, Glucose, Mannose, Fucose, Ribose und Xylose papierechromatographisch nachgewiesen werden.

Vermutlich lassen sich die angeführten unterschiedlichen Befunde in der Schleimzusammensetzung gleicher Bakterienarten auf die Verschiedenheit der zur Untersuchung herangezogenen Stämme gleicher Arten zurückführen. So fanden auch EAGON u. DEDONDER (1955) eine qualitative Verschiedenheit in der Schleimzusammensetzung verschiedener *Pseudomonas fluorescens*-Stämme und DUDMAN u. WILKINSON (1956) qualitative und quantitative Unterschiede bei verschiedenen *Aerobacter-Klebsiella*-Stämmen.

Wieweit die Ernährung der Organismen bei diesen Vorgängen eine Rolle spielt, ist nicht bekannt. Allerdings soll die Art der gebotenen C-Quelle die qualitative (*B. circulans*, FORSYTH u. WEBLEY 1949) und quantitative (*Aerobacter aerogenes*, WILKINSON u. Mitarb. 1955) Zusammensetzung der Schleime nicht beeinflussen. Lediglich die Menge der gebildeten Schleime scheint unter diesen Bedingungen zu variieren. Bei geringem Angebot von Stickstoff und Phosphor wird nach DUGUID u. Mitarb. (1953) die Schleimbildung stark gefördert, vorausgesetzt, daß genügend assimilierbare C-Quelle vorhanden ist. Ob unter diesen Bedingungen qualitative oder quantitative Unterschiede in der Schleimzusammensetzung auftreten, ist nicht bekannt.

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen sollten mehrere, aus dem Boden isolierte, schleimbildende Bakterien und bekannte Arten unserer Sammlung auf ihre Schleimzusammensetzung geprüft werden. Außerdem sollten erste Versuche unternommen werden, die die Wirkung von Bakterienschleim auf schwerlösliche anorganische Stoffe zeigen.

Methodik

1. Organismen und Kulturbedingungen

Aus der Instituts-Sammlung wurden zur Untersuchung auf ihre Schleimzusammensetzung folgende Stämme verwendet: *Aerobacter aerogenes* (Stamm Nr. 1559) auf Molke-Pepton Nährösung: 500 ml Molke; 500 ml dest. Wasser; 0,5% Pepton; 0,1% KH_2PO_4 ; pH 6,8. — *Azotobacter chroococcum* (Stamm Nr. 1602). Nährösung: Mannit 2%; KH_2PO_4 0,1%; CaCO_3 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Spuren; pH 7,2. — *Bacterium radicicola* (Stamm Nr. 1552). Nährösung: Mannit 1%; K_2HPO_4 0,05%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02%; NaCl 0,01%; CaCO_3 0,3%; 50 ml Hefewasser/1000 ml dest. Wasser; pH 6,8. — *Pseudomonas tumefaciens* (Stamm Nr. 1547). Nährösung: Glucose 1%; Pepton 0,1%; KH_2PO_4 0,1%; pH 7,2. — *Bacterium violaceum* (Stamm Nr. 1612). Nährösung: Glucose 1%; Pepton 0,1%; KH_2PO_4 0,1%; pH 7,2.

Neu-Isolierungen: Stamm *W 3 G*, aus Walderde isoliert. Nährösung: Glucose 1%; Pepton 0,1%; KH_2PO_4 0,1%; pH 7,2. — Stamm *W 4 G*, aus Walderde isoliert. Nährösung wie bei *W 3 G*. — Stamm *W 5 R*, aus Walderde isoliert. Nährösung: Rohrzucker 1%; Pepton 0,1%; KH_2PO_4 0,1%; pH 7,2. — Stamm *F 3 R*, aus Ackererde isoliert. Nährösung wie bei *W 5 R*.

Alle Organismen wurden zur Schleimgewinnung in Schüttelkulturen herangezogen (*Ps. tumefaciens* in Standkulturen, vgl. EAGON 1956). Die Wachstumsdauer betrug 3—6 Tage bei 27° C.

2. Isolierung und Reinigung der Polysaccharide

Die Flüssigkeitskulturen, die meist viscos waren, wurden mit destilliertem Wasser verdünnt, kurz aufgekocht und 1 Std bei 7000 U/min zentrifugiert. Hierbei konnten, durch die Viscosität der Lösungen bedingt, noch nicht alle Zellen aus der Schleimlösung entfernt werden. Im Überstehenden erfolgte die Fällung der Polysaccharide mit der 4fachen Menge 95% igen Äthylalkohols, nach vorheriger Einstellung der Lösung auf pH 6—7. Die weitere Reinigung erfolgte nach WILKINSON u. Mitarb. (1955, Methode C). Nach Stehenlassen über Nacht wurden die gefällten Polysaccharide abzentrifugiert und in dest. Wasser gelöst. Nach wiederholtem Umfällen, Lösen und Zentrifugieren konnten alle noch verbliebenen Zellreste entfernt werden. Die Lösung war dann klar und je nach Polysaccharidgehalt mehr oder weniger viscos.

Eiweiß wurde in Anlehnung an SEVAG (1934) durch Schütteln von 1 Teil Schleimlösung mit 0,25 Teilen Chloroform und 0,1 Teil Butanol und anschließendem Zentrifugieren abgetrennt. Zur Herabsetzung des Aschegehaltes wurde 48 Std gegen dest. Wasser dialysiert, die Polysaccharide dann erneut gefällt, mehrmals mit Äthanol und Äther gewaschen und im Vacuumexsiccator bei Zimmertemperatur getrocknet.

3. Identifizierung der Polysaccharidbausteine

Hydrolyse (nach FORSYTH u. WEBLEY 1949). 20 mg Polysaccharid wurden mit 1 ml 1 n H_2SO_4 48 Std bei 100° C hydrolysiert. Die lange Hydrolysenzeit war zum vollständigen Aufschluß der Polysaccharide unbedingt nötig. Eine 2. Probe wurde mit 0,1 n H_2SO_4 30 min bei 100° C hydrolysiert und diente zur Prüfung auf Fructose und andere säureempfindliche Furanose-Zucker. Nach der Hydrolyse wurde mit festem, fein gepulvertem $BaCO_3$ neutralisiert (Kongorot), und die überstehende Lösung nach kurzem Zentrifugieren zur Papierchromatographie verwendet.

Die Identifizierung der Polysaccharidbausteine erfolgte papierchromatographisch nach Angaben von SMITH u. POLLARD (1952) mit Butanol:Pyridin:Wasser im Verhältnis 3 : 2 : 1,5 im Durchlaufchromatogramm (Papier Schl. & Sch. 2043 b). Die in den Bakterienschleimen gefundenen Zucker und Uronsäure trennten sich damit gut. Als Sprühreagens wurde Anilinphthalat verwendet, für Ketozucker Naphthoresorcin-HCl.

Eine quantitative Bestimmung der einzelnen Hydrolysenprodukte war für die vorliegenden Zwecke nicht erforderlich, eine grobe Bestimmung erfolgte durch Vergleich der Fleckgröße bzw. Farbintensität der Test- und Hydrolysenzucker.

Ergebnisse

1. Zusammensetzung der Bakterienschleime

In Tab. 1 sind die nach Hydrolyse der verschiedenen Bakterienschleime nachweisbaren Zucker und Glucuronsäure zusammengestellt. Sie sind später (S. 176) zusammengefaßt besprochen. Für unsere Zwecke genügte die Angabe in Relativwerten.

2. Lösungsversuche

Für die Lösungsversuche haben wir *Aerobacter aerogenes* und *Pseudomonas tumefaciens* ausgewählt. Der Schleim dieser Organismen unterschied sich vor allem im Uronsäuregehalt und war deshalb zum Nachweis einer möglichen spezifischen Uronsäurewirkung besonders geeignet.

Zunächst interessierte, ob während des Wachstums der Bakterien schwerlösliche anorganische Stoffe gelöst werden.

A. *Aerobacter aerogenes*

1. Eine Nährlösung, bestehend aus 1,5% Glucose, 0,5% Asparagin und 50 ml quarzdest. Wasser, wurde bei pH 7,2 mit einer Suspension von *Aerobacter aerogenes* beimpft und auf der Schüttelmaschine bei 28°C vorkultiviert. Der Organismus wuchs ohne einen Zusatz von KH_2PO_4

Tabelle 1. Papierchromatographischer Nachweis und prozentualer Anteil von Zucker und Glucuronsäure in Hydrolysaten verschiedener Bakterienschleime

Organismen	Glucose	Galaktose	Rhamnose	Mannose	Fucose	Xylose	Glucuron-säure
<i>Aerobacter aerogenes</i>	40	35	—	—	Spur	—	25
<i>Bact. radicicola</i>	50	30	Spur	Spur	—	—	20
<i>Azotobact. chroococcum</i>	Spur	45	30	Spur	—	—	25
<i>Ps. tume-faciens</i>	100	—	—	—	—	—	—
<i>Bact. violaceum</i>	40	20	Spur	30	10	—	Spur
Stamm W 3G	40	20	—	20	—	Spur	20
Stamm W 4G	25	30	—	30	Spur	—	15
Stamm W 5R	30	30	Spur	30	—	—	10
Stamm F 3R	30	30	—	30	—	—	10

Die Zahlen geben für jeden Organismus die Relativwerte an. Fructose wurde in keinem Falle festgestellt.

verhältnismäßig gut und bildete vor allem gut Schleim. Nach 36 Std wurde in die Kolben 300 mg BaSO_4 , $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$ oder $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ gegeben und unter Schütteln weiter bebrütet. Die verschiedenen Zusätze bewirkten Unterschiede in der Größe der Schleimhüllen. In den Kulturen mit Zusatz von Bariumphosphat oder Bariumsulfat war das weitere Wachstum mäßig bis gut, die gebildeten Schleimhüllen waren ungewöhnlich groß. Die relativ geringe Giftwirkung des Bariums lässt sich vielleicht auf die ausgeprägte Adsorptionswirkung der Bakterienschleime gegenüber Ionen zurückführen (ROREM 1955). Schwächer war die Ausbildung der Schleimhüllen bei Zugabe von Eisenphosphat, die Zellen waren stark verkleinert, das Wachstum mäßig bis gut. Als Kontrollen dienten Kolben mit Nährlösung und 300 mg BaSO_4 , $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$ oder $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$, die unbeimpft blieben. Nach 5 Tagen wurde der Versuch abgebrochen, Kulturen

und Kontrollen scharf zentrifugiert. Die pH-Werte der Kulturen und auch der Kontrollen waren gesunken:

Eisenphosphat-Kultur	pH 4,5	Kontrolle pH 5,5
Bariumphosphat-Kultur	pH 5,0	Kontrolle pH 6,5
Bariumsulfat-Kultur	pH 4,0	Kontrolle pH 5,7

Die Prüfung auf Phosphat, das bei einem Lösungsvermögen des Schleimes in der ursprünglichen phosphatfreien Nährlösung vorhanden sein mußte, erfolgte colorimetrisch nach der Methode von FISKE u. SUBBAROW (1925), während der Nachweis der SO_4^{--} -Ionen durch Zugabe von festem BaCl_2 in salzsaurer Lösung erfolgte. Der auftretende Niederschlag von BaSO_4 wurde im Lange-Colorimeter densidometrisch ausgewertet.

Die Ergebnisse, Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen An-sätzen mit jeweils mehreren Kulturen, sind in Tab. 2 zusammengestellt. Die Wirkung der Bakterien auf das Löslichmachen von P und SO_4^{--} ist deutlich zu erkennen.

Tabelle 2. P- und SO_4 -Gehalt der zellfreien Kulturlösungen von *Aerobacter aerogenes* in $\gamma/5 \text{ ml}$ (in Klammern Relativwerte bezogen auf Kontrolle = 100)

	P aus $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$	P aus $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$	SO_4 aus BaSO_4
Kultur	86	230	135
Kontrolle	12 (100)	57 (100)	45 (100)
Differenz*	74 (616)	173 (303)	90 (200)

* Lösung durch Bakterieneinfluß.

2. Mit quarzdest. Wasser wurde eine 0,75%ige *Aerobacter aerogenes*-Schleimlösung, pH 7, hergestellt.

Es wurden 2 Proben angesetzt:

50 ml Schleimlösung pH 7 + 300 mg Bariumphosphat,
50 ml Schleimlösung pH 7 + 300 mg Eisenphosphat.

Phosphat konnte vor Zusatz in der Schleimlösung mit der oben angeführten Methode nicht nachgewiesen werden.

Die Kontrollen enthielten keinen Schleim, lediglich quarzdest. Wasser.

Zur Verhütung von Infektionen wurde den Kolben Chloroform (0,5 ml) zugesetzt. Die Kolben standen 14 Tage auf der Schüttelmaschine.

pH-Werte nach Ablauf des Versuches:

Schleimlösung + Bariumphosphat	pH 5,5
Kontrolle	pH 6,0
Schleimlösung + Eisenphosphat	pH 5,3
Kontrolle	pH 6,0

Die Lösungen wurden bis zur völligen Klarheit zentrifugiert (etwa 1 Std bei 7000 U/min) und zur Prüfung auf Phosphat verwendet.

In Abwandlung der vorstehend angegebenen Methode wurden alle auf Phosphat zu prüfenden Lösungen nach Zugabe der Reagentien 5 min im kochenden Wasser-

bad erhitzt. Die Erhitzung war erforderlich, da anderenfalls keine Blaufärbung der Reaktionsgemische auftrat, was auf die Viscosität der Schleimlösung oder auf eine verhältnismäßig feste Bindung des gelösten Phosphates an den Schleim zurückgeführt werden kann.

Tabelle 3. P-Gehalt der Schleimlösungen und Kontrollen in γ/5 ml
(*Aerobacter aerogenes*)

	P aus $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$	P aus $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$
Schleim	140	465
Kontrolle	55 (100)	155 (100)
Differenz*	85 (154)	310 (200)

* Lösung durch Schleimeinfluß.

Die Ergebnisse zeigt Tab. 3. Die Löslichkeit wird also durch den isolierten Schleim ebenfalls erhöht. Es fällt dabei auf, daß durch dest. Wasser mehr P gelöst wurde als durch Nährlösung (ohne Bewuchs, Tab. 2). Der Grund dafür könnte möglicherweise in der Zurückdrängung der Löslichkeit durch die Bestandteile der Nährlösung zu suchen sein.

B. *Pseudomonas tumefaciens*

(Die Versuchsanordnung entsprach den Angaben unter A 1)

Das Wachstum war in den Bariumsulfat-Kulturen verhältnismäßig gut, die gebildeten Schleimhüllen waren außergewöhnlich groß. Nach Zusatz von Bariumphosphat bildete *Ps. tumefaciens* ebenfalls sehr gut Schleim, das Wachstum war mäßig bis gut. Schleimbildung unter Eisenphosphatzusatz sehr gut, Wachstum mäßig.

Die pH-Werte betrugen nach Ablauf der Kultivierung:

Eisenphosphat-Kultur	pH 8,0	Kontrolle pH 5,5
Bariumphosphat-Kultur	pH 7,8	Kontrolle pH 6,5
Bariumsulfat-Kultur	pH 8,0	Kontrolle pH 5,8

Tabelle 4. P- und SO_4 -Gehalt der Nährlösungen in γ/5 ml (*Pseudomonas tumefaciens*)

	P aus $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$	P aus $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$	SO_4 aus BaSO_4
Kultur	22	135	375
Kontrolle	12 (100)	50 (100)	55 (100)
Differenz*	10 (83)	85 (170)	320 (581)

* Lösung durch Bakterieneinfluß.

Tab. 4 zeigt die erhaltenen Ergebnisse, die qualitativ den vorigen entsprechen. Die sehr geringe Löslichkeit von P aus $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ ist zweifellos auf den hohen pH-Wert der Kultur (8,0; Pepton als N-Quelle) zurückzuführen, wodurch die Löslichkeit noch weiter heruntergedrückt wird, die sowieso stets wesentlich geringer ist als bei $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$.

2. Mit Trockenschleim, der von *Ps. tumefaciens*-Kulturen gewonnen worden war, wurde eine 0,75%ige Schleimlösung vom pH 7 mit quarzdest. Wasser hergestellt. Die Schleimlösung enthielt geringe Mengen nachweisbaren Phosphates, das bei der Berechnung der Werte mit berücksichtigt wurde.

Je 50 ml der Schleimlösung wurden mit 300 mg Bariumphosphat oder Eisenphosphat versetzt und 14 Tage auf der Maschine geschüttelt.

pH-Werte nach Ablauf des Versuches:

Schleimlösung + Bariumphosphat	pH 5,8
Kontrolle	pH 6,0
Schleimlösung + Eisenphosphat	pH 5,7
Kontrolle	pH 6,0

Bei der Prüfung auf Phosphat wurden die in Tab. 5 gezeigten Werte erhalten. Noch deutlicher als in Tab. 4 zeigt sich hier die sehr viel geringere Löslichkeit des P aus $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ gegenüber $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, die schon in Tab. 2 und 3 hervortritt. Das mag mit spezifischen Eigenschaften der Schleime zusammenhängen, da in Tab. 2 u. 3 der pH-Wert nicht entscheidend sein kann.

Tabelle 5. P-Gehalt der Schleimlösungen und Kontrollen in γ/5 ml (*Pseudomonas tumefaciens*)

	P aus $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$	P aus $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$
Schleim	53	337
Kontrolle	50 (100)	165 (100)
Differenz *	3 (3)	172 (106)

* Lösung durch Schleimeinfluß.

Besprechung der Ergebnisse

In den Hydrolysenprodukten der Schleime von 9 Bakterienstämmen konnten insgesamt 6 verschiedene Zucker und Glucuronsäure nachgewiesen werden (Tab. 1). Am häufigsten waren Glucose, Galaktose, Mannose und Glucuronsäure vertreten, während Rhamnose (*Azotobacter*), Fucose (*Bact. violaceum*) und Xylose-(Stamm W 4 G) nur selten und oft nur in Spuren auftreten. Fructose konnte bei keinem der untersuchten Stämme nachgewiesen werden. Im Vergleich zu vorliegenden Literaturangaben zeigte *Aerobacter aerogenes* einen relativ hohen Galaktoseanteil, während bei *Azotobacter chroococcum* der Schleim keine Glucosebausteine enthielt und neben Glucuronsäure vor allem aus Galaktose und Rhamnose aufgebaut war. Letzterer Bestandteil wurde unseres Wissens nach bislang nicht im Schleim von *Azotobacter* nachgewiesen. Die Beispiele zeigen noch einmal die oben schon erwähnte Stammspezifität der Schleimzusammensetzung bzw. die Bedeutung veränderter Kulturweise. Glucuronsäure war in 8 der 9 Stämme nachzuweisen, wobei der Gesamt-

anteil den bisher bekannten Befunden entspricht. Keine Glucuronsäure enthielt der Schleim von *Ps. tumefaciens*.

Die Löslichkeit der schwerlöslichen Phosphate wurde durch wachsende Bakterienkulturen gegenüber sterilen Kontrollen bedeutend erhöht (Tab. 2 u. 4). Dieser Befund entspricht den von anderen Autoren an Reinkulturen und Bodenversuchen mitgeteilten Beobachtungen. Für die Ursache der Löslichkeitssteigerung können wir neben den sich ändernden pH-Werten die chelatisierende Wirkung vieler Stoffwechselprodukte (organischer Säuren usw.) verantwortlich machen. Eine Beteiligung des Bakterienschleimes an diesen Vorgängen läßt sich bei dieser Versuchsanstellung natürlich nicht nachweisen.

In Tab. 3 u. 5 haben wir die P-Mengen angegeben, die durch die alleinige Einwirkung der Schleime und der damit verbundenen Ausschaltung störender Faktoren gelöst werden. Die Löslichkeitssteigerung gegenüber den schleimfreien Kontrollen betrug bei *Aerobacter aerogenes* für $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ 154%, für $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$ 200%, bei *Ps. tumefaciens* 3% bzw. 106%. Wie weit die stärkere Beeinflussung der Löslichkeit durch den Schleim von *Aerobacter aerogenes* auf dessen Glucuronsäuregehalt (bei *Pseudomonas tumefaciens* fehlend) zurückgeführt werden kann, ist aus den angeführten ersten Versuchen noch nicht zu entscheiden.

Fest steht jedenfalls, daß neben dem starken Einfluß wachsender Bakterienkulturen auf schwerlösliche anorganische Verbindungen auch dem Bakterienschleim eine lösende Eigenschaft zugeschrieben werden kann. Wir haben schon eingangs darauf hingewiesen, daß sich im Boden uronsäurehaltige Polysaccharide im Gegensatz zu organischen Säuren auch unter aeroben Bedingungen anreichern können und glauben deshalb, daß die Bakterienschleime auch am natürlichen Standort, neben ihrer Bodenkrümel stabilisierenden Wirkung (MARTIN u. Mitarb. 1955) einen Einfluß auf schwerlösliche Mineralstoffe ausüben können, selbst, wie gezeigt wurde, wenn Uronsäuren fehlen. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß bei anderen Beobachtungen über Silikat- oder Gesteinszersetzungen durch Mikroorganismen (z. B. TEŠIĆ u. TODOROVIĆ 1952, PAYNE u. Mitarb. 1933) von einer auffällig schleimigen Beschaffenheit der dabei beteiligten Organismen berichtet wird, ohne daß allerdings eine mögliche Beziehung zwischen Schleim und Lösungsvermögen in Betracht gezogen wird.

Die Mikroorganismen stellen daher einen wichtigen Faktor bei der Gesteinsverwitterung dar.

Zusammenfassung

1. In den Hydrolysaten der Schleime von 9 Bakterienstämmen wurden Glucose, Galaktose, Mannose, Rhamnose, Xylose, Fucose und Glucuronsäure in wechselnden Mengenanteilen nachgewiesen.

2. Der Schleim von *Azotobacter chroococcum* war hauptsächlich aus Galaktose und bisher nicht beschriebenen Rhamnose-Bausteinen aufgebaut.
3. Wachsende Kulturen von *Aerobacter aerogenes* und *Pseudomonas tumefaciens* zeigten ein beträchtliches Lösungsvermögen für Eisen- und Bariumphosphat sowie Bariumsulfat.
4. Der von den beiden Organismen gebildete Schleim unterschied sich hauptsächlich durch das Fehlen von Glucuronsäure bei *Ps. tumefaciens*.
5. Durch isolierten Schleim beider Organismen konnten Barium- und Eisenphosphat gelöst werden. Die stärkere Lösungswirkung des Schleimes von *Aerobacter aerogenes* kann vielleicht auf dessen hohen Glucuronsäureanteil zurückgeführt werden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Bereitstellung der Mittel, die das Durchführen dieser Arbeit ermöglichten.

Literatur

- BASSALIK, K.: Z. Gärungsphysiologie, **2**, 1—12. (1912), **3**, 15—42 (1913). — BURGER, M.: Bacterial Polysaccharides, Springfield: Charles C. Thomas Publ. 1950.
- DAVIES, D. A. L.: Biochemic. J. **59**, 696—704 (1955). — DUDMAN, W. F., and J. F. WILKINSON: Biochemic. J. **62**, 289—295 (1956). — DUGUID, J. P., and J. F. WILKINSON: J. Gen. Microbiol. **9**, 174—189 (1953). — DZULYUSKA, J., u. E. MIKLASZEK: Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II, **2**, 101—104 (1954).
- EAGON, R. G., et R. DEDONDER: C. r. Acad. Sci. (Paris) **241**, 527 u. 579 (1955). — EAGON, R. G.: Canad. J. Microbiol. **2**, 673 (1956). — EVANS, T. H., and H. HIBBERT: Adv. Carbohydrate Chem. **2**, 204—233 (1946).
- FISKE, C. H., and Y. S. SUBBAROW: J. Biol. Chem. **66**, 375—400 (1925). — FORSYTH, W. G. C., and D. M. WEBLEY: J. Gen. Microbiol. **3**, 395—399 (1949).
- GEOGHEGAN, M. J., and R. C. BRIAN: Biochemic. J. **43**, 5—13 (1948).
- LAWSON, G. J., and M. STACEY: J. Chem. Soc. (Lond.) **1954**, 1925—1931. — DE LEIZOLA, M., et R. DEDONDER: C. r. Acad. Sci. (Paris) **240**, 1825—27 (1955).
- MANDL, J., and C. NEUBERG: Adv. Enzymol. **17**, 135—155 (1956). — MARTIN, J. P., W. P. MARTIN, J. B. PAGE, N. A. RANEY and J. O. De MENT: Adv. in Agriculture **7**, 2 (1955).
- PAINE, S. G., F. V. LINGGOOD, F. SCHIMMER and T. C. THRUPP: Trans. Roy. Soc. (Lond.) B **222**, 97 (1933). — PFENNIG, N.: Arch. Mikrobiol. **29**, 90—100 (1958).
- QUINNELL, CH. M., S. G. KNIGHT and P. W. WILSON: Canad. J. Microbiol. **3**, 277—288 (1957).
- RIPPEL, A.: Arch. Mikrobiol. **7**, 590 (1936). — RIPPEL, A., G. BEHR u. K. NABEL: Arch. Mikrobiol. **9**, 375—409 (1938). — ROREM, E. S.: J. Bacteriol. **70**, 691 (1955).
- SCHATZ, A., N. D. CHERONIS, V. SCHATZ and G. S. TRELAWSKY: Proc. Pennsylv. Acad. Sci. **28**, 44—51 (1954). — SCHEFFER, F., B. ULRICH u. P. HIESTERMANN: Z. Pflanzenernährg. **76**, 146—155 (1957). — SEVAG, M. G.: Biochem. Z. **243**, 419—429 (1934). — SMITH, P. B., and A. L. POLLARD: J. Bacter. **63**, 129 (1952). — SMITHIES, W. R., and N. E. GIBBONS: Canad. J. Microbiol. **1**, 614—621 (1955). — STACEY, M.: Adv. Carbohydrate Chem. **2**, 162—201 (1946). — STACEY, M., u. R. C. RICKETTS: Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **8**, 28—46 (1952).
- TEŠIĆ, Z. T., u. M. S. TODOROVIĆ: Zemljist i Biljka (Soil and Plant, Belgrad), **1**, 3—18 (1952).
- WILKINSON, F. J., W. F. DUDMAN and G. O. ASPINAL: Biochemic. J. **59**, 446 bis 451 (1955).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Wien)

**Lamelläre Struktur des Chromatoplasmas
von Cyanophyceen in mikroskopischen Dimensionen
und Baueigentümlichkeiten des Protoplasten
von Chroococcus turgidus**

Von

LOTHAR GEITLER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Dezember 1957)

Vor kurzem erbrachten NIKLOWITZ u. DREWS (1956, 1957) sowie DREWS u. NIKLOWITZ elektronenoptisch den wichtigen Nachweis, daß das Chromatoplasma der Cyanophyceen regelmäßig einen submikroskopischen lamellären Aufbau besitzt. Die Angaben sind durch überzeugende, sehr klare elektronenoptische Bilder belegt. Der Lamellenbau kommt also nicht nur den Plastiden der anderen chlorophyllführenden Pflanzen zu, sondern kennzeichnet auch die analoge (nicht homologe) undifferenziertere Ausbildung des Assimilationsapparates der Blaualgen und offenbar überhaupt aller photosynthetisch autotrophen, Assimilationspigmente führenden Organismen (vgl. NIKLOWITZ u. DREWS 1957, S. 160). Der von den Autoren auf S. 159 zitierte Satz: „Die Assimilationspigmente sind nicht an Plastiden gebunden, sondern in einer analogen undifferenzierten Struktur, dem peripheren Chromatoplasma enthalten“ (GEITLER 1955), ist dennoch nicht überholt. Denn er bedeutet nur, daß Plastiden und Chromatoplasma verschiedene Dinge sind und das Chromatoplasma im Vergleich zu den Plastiden undifferenziert ist (wie „Chromidialapparat“ und Nucleoide gegenüber dem Zellkern). Daß das Chromatoplasma aber nicht homogen ist, sondern submikroskopisch sehr fein organisiert sein muß, war aus allgemeinen Gründen schon immer anzunehmen. Um so wichtiger ist nun der tatsächliche Nachweis einer bestimmten Feinstruktur, und dazu einer solchen, die im wesentlichen mit der der Plastiden übereinstimmt. Trotz seiner sehr distinkten Lamellierung läßt sich aber das Chromatoplasma, wie es auch dem mikroskopischen Aussehen entspricht, nicht scharf gegen das Centroplasma abgrenzen (DREWS u. NIKLOWITZ, NIKLOWITZ u. DREWS)¹.

¹ NIKLOWITZ u. DREWS gebrauchen daher ganz richtig den Ausdruck „Chromatoplasma“, während ELBERS, MINNAERT u. THOMAS es fälschlicherweise als „Chloroplast“ bezeichnen.

Die Lamellen liegen zu mehreren parallel angeordnet in Paketen, wobei sich charakteristische Unterschiede bei Oscillatoriaceen und Nostocaceen zeigen. Bei *Phormidium frigidum* z. B. beträgt die Zahl der Lamellen vier (NIKLOWITZ u. DREWS 1957). In bestimmten Fällen sind die Lamellen parallel zur Längsachse des Zellfadens und auf dem Querschnitt ± verbogen konzentrisch angeordnet, bei *Phormidium retzii* verlaufen sie radiär. In diesen Fällen sind die Lamellen und damit das Chromatoplasma deutlich peripher in der Zelle lokalisiert. Bei *Oscillatoria limosa* dagegen reicht das Chromatoplasma schollenförmig, oft weit nach innen, in das Centroplasma hinein (diese Feststellung ist auch von Bedeutung für den unten geschilderten Zellbau von *Chroococcus*). Bei Nostocaceen ist die Parallelschichtung der Lamellen in den Paketen viel undeutlicher. Eine sehr klare Parallelschichtung, aber in stark und nach verschiedenen Richtungen verbogenen Lamellenpaketen zeigt die schöne elektronenoptische Aufnahme bei ELBERS, MINNAERT u. THOMAS (Fig. 10). Dem Text zufolge enthält jedes Paket 4—6 Lamellen, auf dem Bild sind aber bis zu 9 sichtbar. Die Aufnahme ist besonders lehrreich für den Vergleich mit *Chroococcus*.

Alle diese Strukturen befinden sich nicht so weit unterhalb der Grenze der mikroskopischen Sichtbarkeit, als man annehmen könnte. Aus den meisten Abbildungen, besonders aus der zuletzt genannten von *Synechococcus*, ergibt sich, daß die Lamellierung schon bei doppelter Größe mikroskopisch sichtbar wäre. In etwas vergrößerter Ausbildung läßt sie sich tatsächlich unter bestimmten physiologischen Voraussetzungen in den Zellen mit guter Optik ohne weiteres erkennen, wie die Abb. 1—4 zeigen¹. Auf diesen Bildern von *Chroococcus turgidus* sieht man Pakete von 4—6 oder auch bis 8 annähernd parallel orientierten Lamellen, wobei der Lamellenabstand im Bild etwa 1 mm beträgt, was einem wirklichen Abstand von 0,8 μ entspricht. Die Ausmessung der Fig. 10 bei ELBERS, MINNAERT u. THOMAS ergibt für *Synechococcus cedrorum* einen Lamellenabstand von etwa 0,06 μ . Die Abbildungen bei NIKLOWITZ u. DREWS zeigen ähnliche Größenverhältnisse.

Das mikroskopische Sichtbarwerden eines Lamellenbaus läßt sich außer bei *Chroococcus turgidus* auch bei *Synechococcus aeruginosus*, *Plectonema wolfei* und *Lyngbya maiuscula* beobachten sowie vermutlich auch bei anderen Arten, bei denen die Voraussetzungen zu seiner Beobachtung noch nicht gegeben waren. Es müssen nämlich die Zellen sich in einem bestimmten Zustand physiologischer Depression befinden. Dieser Zustand ist, abgesehen von der Plasmastruktur, an der Verfärbung von Blaugrün zu gelblichen Tönen leicht erkennbar, was besonders an dem hier eingehender behandelten *Chroococcus turgidus* auffällt, da seine normale Färbung

¹ Die Photographien wurden mit Zeiss Apochromat 90, 1,30 und Komp.-Okular 10fach in — nicht einmal monochromatischem — Orangelicht aufgenommen.

bung ein sehr intensives Blaugrün ist. Die Verfärbung allein kennzeichnet den Zustand allerdings nicht, denn Gelbfärbungen kommen auch sonst vor (z. B. als Ausdruck von „Stickstoffchlorose“), ohne daß Lamellen auftreten. Außerdem gibt es Blaualgen, wie manche *Chamaesiphon*-Arten, die normalerweise ähnlich gelblich gefärbt sind. Infolge unserer noch sehr mangelhaften Kenntnisse über physiologisch bedingte Strukturveränderungen des Blaualgenprotoplasten und seiner Einschlüsse kann nicht einmal der Versuch gemacht werden, den Zustand näher zu präzisieren.

Der entsprechende physiologische Zustand stellt sich bei dem genauer untersuchten *Chroococcus turgidus*, wie mehrjährige Beobachtungen zeigen, gewöhnlich ein, wenn die Proben aus Hochmoorschlenken, die ihn enthalten, in gewöhnlichen bedeckelten Glasschalen bei Temperaturen unter 10° C im diffusen Tageslicht aufgestellt werden. Die saure Reaktion des Mediums geht dabei infolge Alkaliaabgabe aus dem Glas zurück. Nach etwa 2 Monaten ist bei einem pH von \pm 6 ein großer Teil der *Chroococcus*-Zellen nach Gelb verfärbt und zeigt Lamellenbau im Chromatoplasma. Die Zellteilungen sind sistiert. Bei *Synechococcus aeruginosus*, ebenfalls einer Hochmooralge, tritt der Lamellenbau an Exemplaren auf, die im Freiland eben überwintert haben. Im Fall von *Plectonema* und *Lyngbya* handelt es sich um einzelne Gelegenheitsbeobachtungen, die keine ökologischen Einblicke ermöglichten.

Die Struktur muß jedenfalls als „pathologisch“ angesehen werden; sie bedeutet offenbar eine Schädigung des normalen Assimilationsapparats, womit ja auch die veränderte Pigmentierung im Einklang steht. Doch ist sie, zumindest noch in den hier abgebildeten Stadien von *Chroococcus turgidus*, reversibel. In 0,01%iger saurer Knopscher Nährlösung mit Torfbeigabe „ergrünen“ die Zellen und nehmen nach etwa drei Wochen wieder ihr normales Aussehen an, d. h. zeigen ein gleichmäßig feinkörniges, blaugrünes Chromatoplasma¹.

Der Effekt des besonderen physiologischen Zustands, welcher Natur er im einzelnen auch sein mag, ist jedenfalls der, daß die submikroskopischen Lamellen des Chromatoplasmas an Dicke zunehmen und daß ihre Abstände in den Paketen größer werden. Allerdings fehlen noch für *Chroococcus turgidus* und die anderen genannten Arten elektronenoptische Bilder, die einen unmittelbaren Vergleich ermöglichen könnten. Doch zeigt der Vergleich vor allem mit der erwähnten elektronenoptischen Aufnahme von *Synechococcus cedrorum*, aber auch mit manchen Bildern von NIKLOWITZ u. DREWS, daß es sich um eine grundsätzlich gleiche Struktur handelt, die also offenbar auf die submikroskopische Lamellierung zurückgeht und diese in etwas vergrößerter Ausbildung in mikroskopischer Sichtbarkeit darstellt.

¹ Über die mikroskopischen Strukturen des Chromatoplasmas vgl. GEITLER 1936.

Charakteristisch ist die parallele Anordnung der Lamellen in Paketen, die unter sich beliebig orientiert sind, woraus sich eine im einzelnen regellose, aber im ganzen durchschnittlich gleichmäßig-unorientierte Struktur ergibt. Im optischen Schnitt überwiegt allerdings stellenweise eine bevorzugte radiäre Ausrichtung (wie sie NIKLOWITZ u. DREWS bei manchen

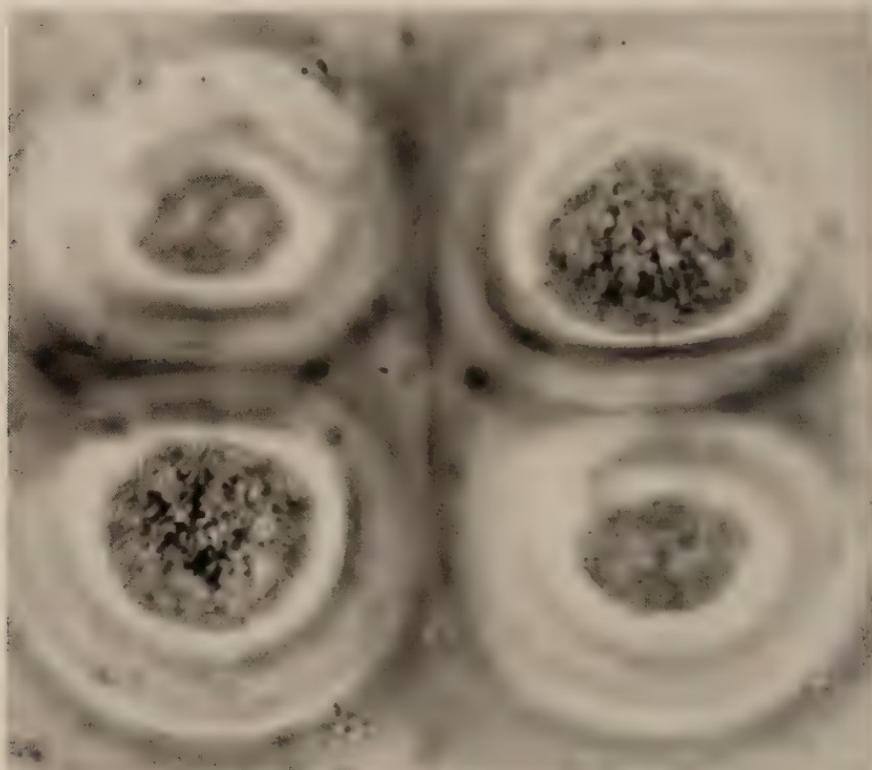


Abb. 1. *Chroococcus turgidus*, achtzellige Kolonie; vier Zellen ungefähr in der Bildebene; in der Zelle rechts unten Lamellenstruktur der obersten Chromatoplasmakuppe, in der Zelle links unten und rechts oben Lamellenstruktur der tieferen Region des peripheren Chromatoplasmas sichtbar.

Photo nach dem Leben; etwa 1600fach

Arten elektronenoptisch feststellten). Charakteristisch ist ferner, daß die Anzahl der Lamellen je Paket ziemlich konstant ist, nämlich 4—6, seltener auch 7 oder 8 beträgt, was mit den elektronenoptischen Bildern übereinstimmt. Die Lamellen sind gerade oder leicht verbogen.

Da die Größe der Lamellen und Pakete gegenüber ihren elektronenoptischen Dimensionen zugenommen hat, muß ihre Anzahl entsprechend gesunken sein, sofern sie das gleiche Areal in der Zelle einnehmen, was anzunehmen ist. Ob dabei die ursprünglichen Lamellen sich tatsächlich vergrößert haben, wobei eine gewisse Anzahl „verschwinden“ müßte,

oder ob die vergrößerten durch Verbackung mehrerer submikroskopischer entstanden sind, was wahrscheinlicher ist, läßt sich zunächst nicht sicher entscheiden. Auf jeden Fall ist die Vergrößerung mit einer Verkleinerung der Oberflächen verbunden und muß mit einer Insuffizienz des Assimilationsapparats einhergehen.

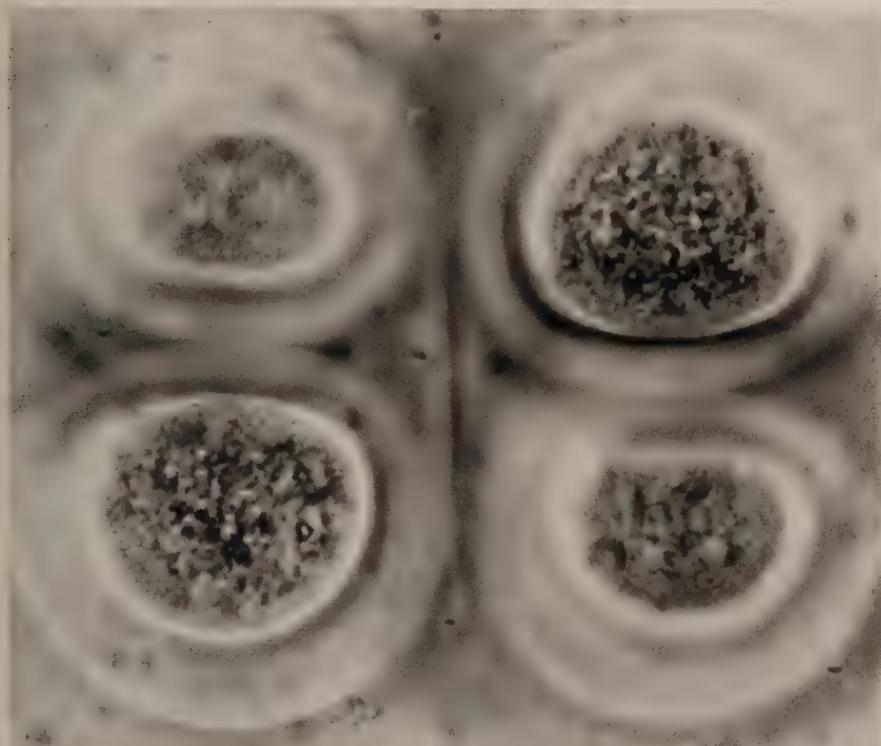


Abb. 2. *Chroococcus turgidus*, dieselbe Kolonie wie in Abb. 1 bei tieferer Einstellung im Mikroskop: Lamellenstruktur der obersten Chromatoplasmakuppe in der Zelle links oben, etwas tiefer rechts unten; in den Zellen links unten und rechts oben ist ein Teil des Centroplasmas getroffen.

Photo nach dem Leben; etwa 1600fach

Bis zu einem gewissen Grad läßt sich das Sichtbarwerden der submikroskopischen Struktur mit dem Auftreten einer mikroskopischen Lamellierung in geschädigten Plastiden vergleichen. Auch hier erfolgt offenbar Verbackung mehrerer Lamellen, in den Zwischenräumen allerdings Aufblähung durch Wasseraufnahme. Doch handelt es sich in diesem Fall um Artefakte mit sehr weitgehender Zerstörung der natürlichen Struktur — daher ihre Irreversibilität —, während es bei den Blaualgen intravitale, noch physiologisch erträgliche, daher reversible Vorgänge sind.

Die Lamellenpakete liegen lückenlos dichtgepackt im Chromatoplasma, welches — auch elektronenoptisch — keine scharfe Abgrenzung

gegen das Centroplasma besitzt. Es finden sich außerdem auch im Centroplasma Pakete, die aber zwischen sich lamellenfreie Räume freilassen (Abb. 4). Offenbar liegt bei *Chroococcus turgidus* eine ähnliche Ausbildung wie bei *Oscillatoria limosa* vor (NIKLOWITZ u. DREWS, 1957, S. 155), bei der die Lamellen „nicht eine ausschließliche Zuordnung zu den peripheren

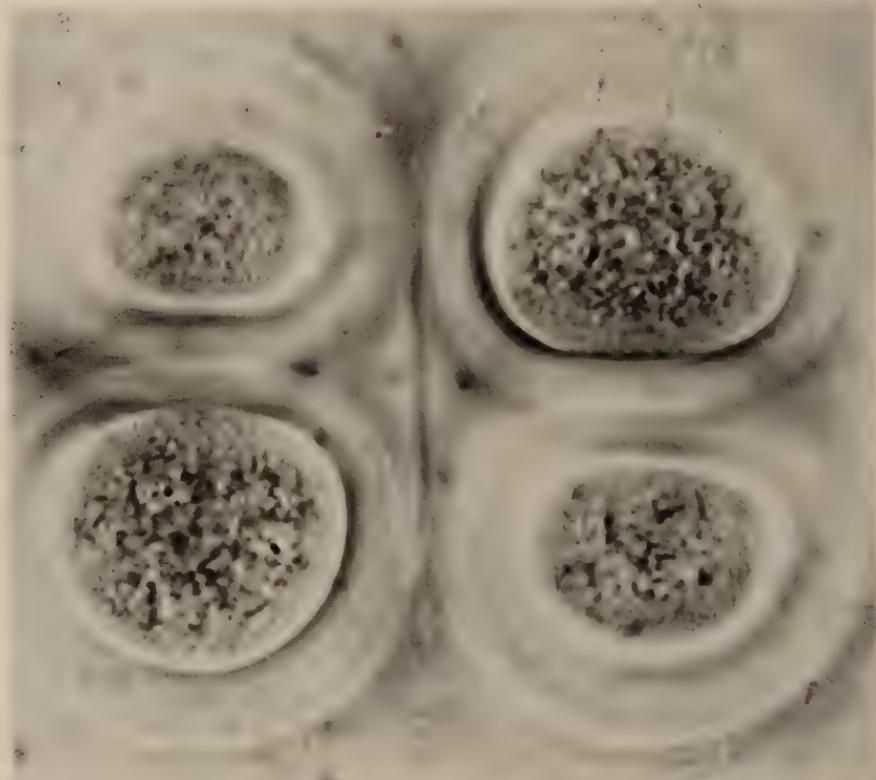


Abb. 3. *Chroococcus turgidus*, dieselbe Kolonie wie in Abb. 1 u. 2 bei noch tieferer Einstellung im Mikroskop; in den Zellen links unten und rechts oben ist das Centroplasma fast zentral getroffen.
Photo nach dem Leben; etwa 1600fach

Bereichen der Zelle“ zeigen. Das Chromatoplasma reicht anscheinend mit sehr unregelmäßigen Ausbeulungen in das Centroplasma hinein. Im Leben sieht man zwar im optischen Querschnitt eine deutliche, ringförmige Chromatoplasmazone, die vor allem durch das Fehlen der centroplasmatischen Einschlüsse sofort auffällt. Ob aber bei *Chroococcus turgidus* die Farbstoffe allein in dieser peripheren Ringzone lokalisiert sind, ließ sich bisher bekanntlich nicht sicher entscheiden. Schon die alten Untersuchungen ACTONS an fixiertem Material lassen erkennen — obwohl sie methodisch und inhaltlich überholt sind —, daß das Centro-

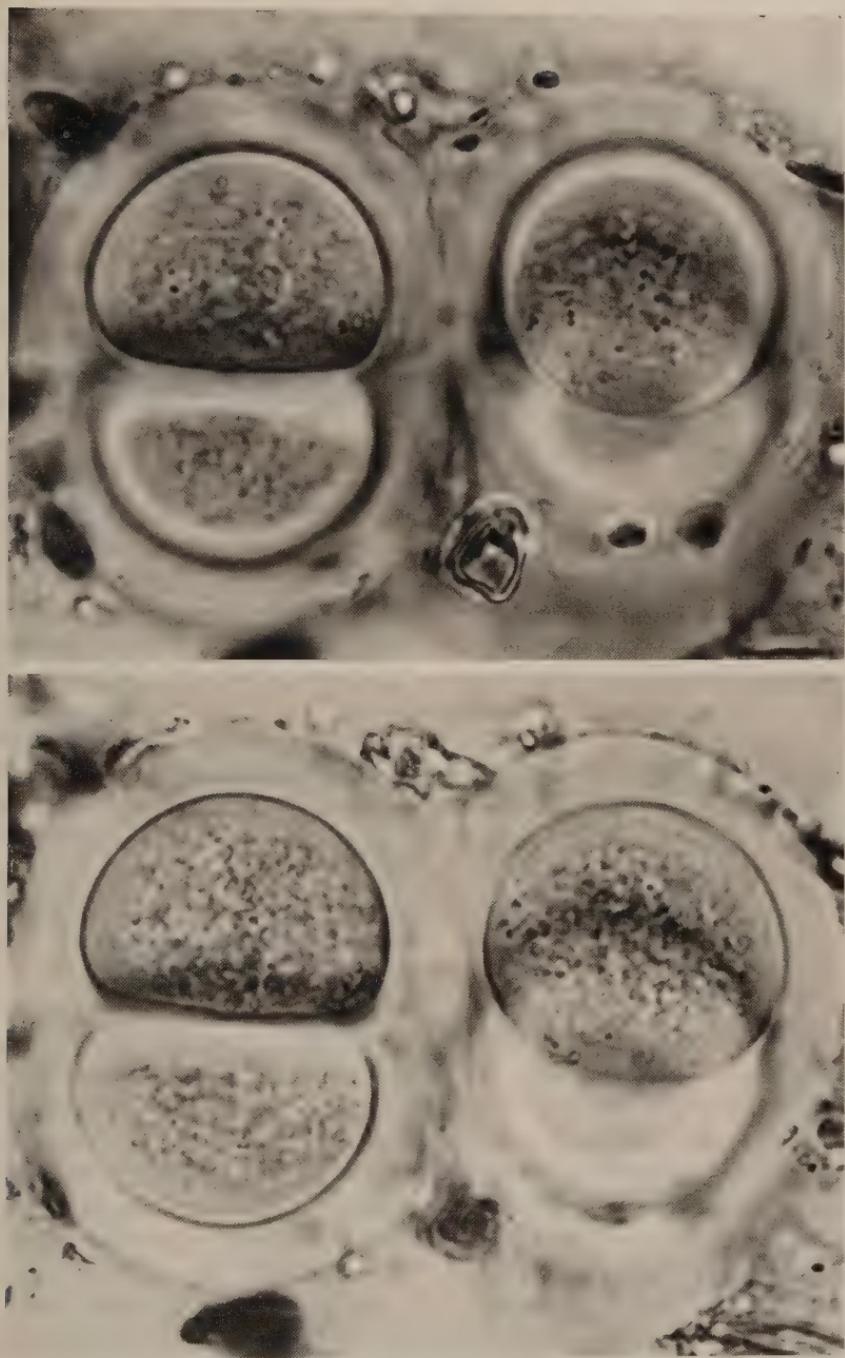


Abb. 4. *Chroococcus turgidus*, vierzellige Kolonie bei zwei verschiedenen Einstellungen im Mikroskop: schwache Ausbildung der Lamellenstruktur des Chromatoplastas, zum Teil in das Centroplasma übergreifend (obere Zelle links); in der linken unteren Zelle der oberen Abbildung sind die Lamellen im Flächenbild der Chromatoplasmakuppe verhältnismäßig gut erkennbar, in den beiden oberen Zellen der unteren Abbildung ist die ± radiäre Anordnung sichtbar. — Photo nach dem Leben; etwa 1600 fach

plasma nicht so klar wie in anderen Fällen vom Chromatoplasma unterscheidbar ist.¹ Das Hineinreichen der Lamellen in das Centroplasma spricht dafür, daß sich auch hier Farbstoffe befinden. Die feulgenpositive Substanz liegt zwischen den centroplasmatischen Lamellenpaketen und erscheint bei Essigearminfärbung als unregelmäßig netzförmige, verwaschene Struktur in Form eines „Chromidialapparats“; in seinen Maschen liegen Lamellenpakete.

Diese Angaben können nur zur ersten Orientierung dienen. Die wirkliche Aufklärung des Protoplastenbaus muß mit Hilfe des Elektronenmikroskops und exakter mikrochemischer Reaktionen erfolgen. Es ist auch nicht möglich, durch mikroskopische Beobachtung allein die Entstehung der Lamellenstruktur zu verfolgen, da sie ja jenseits der mikroskopischen optischen Auflösung einsetzt: man findet teils Zellen mit gleichmäßig körnigem Chromatoplasma und teils solche, in denen die Struktur eben erkennbar wird — die Lamellen erscheinen dünn und aus Körnchen zusammengesetzt, sie lassen sich kaum zufriedenstellend photographieren — und endlich Zellen mit mehr oder weniger ausgeprägtem Lamellenbau (Abb. 4) bis zu solchen mit maximaler Deutlichkeit (Abb. 1—3).

Gegenüber Fixierungsmitteln verhält sich die Struktur im allgemeinen erwartungsgemäß. Mit Chrom-Osmium-Gemischen, z. B. 2BX, wird sie lebensgetreu erhalten. Alkohol Eisessig, der momentan eindringt, läßt sie übertrieben deutlich — wie „gestochen“ — hervortreten; man sieht dann (bei Untersuchung im Fixierungsmittel) noch besser als im Leben, daß keine ausschließliche Lokalisierung auf die periphere Chromatoplasmaschicht besteht. In Zellen, deren Struktur im Leben kaum erkennbar war, wird sie verdeutlicht. 70%iger Alkohol erzeugt eine krampfartige Schrumpfung mit brüsker einseitiger Abhebung des Protoplasten von der Zellwand; er dringt also nicht sofort ein und bewirkt Wasserverzug. Das Plasma wird dabei stark lichtbrechend und die Lamellierung geht optisch unter. Auch nachdem die Schrumpfung — unvollkommen — zurückgegangen ist, bleiben die Lamellen unsichtbar. Sie sind aber nicht zerstört, sondern erscheinen bei Nachbehandlung mit Alkohol-Eisessig wieder. Bei unmittelbarer Behandlung lebenden Materials mit Essigearmin verquellen die Lamellen leicht und werden dadurch undeutlicher. Sie bleiben ungefärbt, während sich zwischen ihnen, wie erwähnt, der „Chromidialapparat“ anfärbt.

Die Lamellenstruktur ist auch ziemlich resistent gegenüber einem langsamen Absterben der Zellen. Schließt man lebendes Material in einem Deckglaspräparat mit Vaseline ein, so ist bei Aufstellung bei Temperaturen unter 10° C nach drei Tagen ein großer Teil der Zellen infolge

¹ Bei *Merismopedia* erscheint das Centroplasma homogener, aber nimmt einen viel kleineren Raum als bei *Chroococcus* ein (vgl. die Abbildungen bei ACTON).

von Sauerstoffmangel abgestorben. Es haben sich dann im Protoplasten blaue Vacuolen gebildet, die das restliche, auch in gelblichen Zellen vorhandene Phycocyan enthalten. Sie sind verschieden groß und besitzen sehr unregelmäßige, oft verästelte Formen, liegen außerdem nicht nur im peripheren, einheitlichen Chromatoplasma — hier übrigens immer leicht subparietal, niemals streng parietal —, sondern auch in zentralen Bezirken. Auch dieser Umstand spricht dafür, daß die Farbstoffe nicht ausschließlich peripher lokalisiert sind, da eine Diffusion in so kurzer Zeit und von außen nach innen im Protoplasten nicht anzunehmen ist. In derart abgestorbenen Zellen bleibt der Lamellenbau — zunächst wenigstens — anscheinend unverändert erhalten.

Welche Vorgänge morphologischer und physiologischer Art der mikroskopischen Lamellenbildung auch immer zugrundeliegen, es zeigt sich jedenfalls, daß bei Strukturuntersuchungen, vor allen auch elektronenoptischen, mit der Beschreibung des Protoplasten — und besonders des noch so unbekannten der Blaualgen — an einem einzigen Zeitpunkt noch nicht alles getan ist. Es ist zu berücksichtigen, daß sich auch Blaualgenzellen in sehr verschiedenen physiologischen Zuständen befinden und daß sich diese morphologisch auswirken können oder müssen. Für das Chromatoplasma ist anzunehmen, daß sein Feinbau je nach seiner Aktivität in der Zelle auch in submikroskopischen Dimensionen sehr verschieden sein wird; die mikroskopisch sichtbar werdende Struktur muß ihre Vorläufer haben. Auch elektronenoptisch werden Schwankungen der Zahl, der Dicke und des Abstands festzustellen sein, so daß bestimmten Maßangaben, die an einem physiologisch homogenen Material gewonnen wurden, in dieser Hinsicht keine allgemeine Bedeutung zukommt.

Zusammenfassung

An mehreren Cyanophyceen tritt im Chromatoplasma unter bestimmten physiologischen Umständen ein Lamellenbau von mikroskopischen Ausmaßen in Erscheinung, der offenbar eine vergrößerte Ausbildung der elektronenoptisch nachgewiesenen Struktur ist. Es handelt sich um Pakete parallel liegender, ± verbogener Lamellen in gleicher Zahl und Anordnung wie in elektronenoptischen Bildern. Die Struktur ist gegenüber der von anderen Cyanophyceen elektronenoptisch nachgewiesenen nur etwa 3 fach vergrößert.

Die entsprechenden physiologischen Zustände stellen sich als eine Depression bestimmter Art dar, die sich in Vergilbung und Sistierung der Zellteilungen ausdrückt. Die mikroskopisch sichtbare Lamellierung erfolgt intravital und ist reversibel. Es finden sich alle Übergänge zwischen normal blaugrünen Zellen mit körnig-homogenem Chromatoplasma und stark gelben mit deutlicher Lamellierung. Es besteht offenbar eine

gleitende Reihe zwischen der submikroskopischen und der mikroskopischen Lamellierung.

Die Beobachtungen zeigen, daß durch die Beschreibung des Protoplasten an einem bestimmten Zeitpunkt sein Feinbau nicht vollkommen erkannt werden kann, sondern daß dieser, wenigstens in quantitativer Hinsicht, stark vom Lebenszustand der Zelle abhängen kann.

Bei *Chroococcus turgidus* bestehen Anzeichen, daß die Assimilationspigmente auch in zentralen Bezirken lokalisiert sind. So reichen die Lamellenpakete des Chromatoplasma in das Centroplasma hinein, und hier bilden sich auch Phycocyanvacuolen. Das Centroplasma wird durch das Chromatoplasma anscheinend zerklüftet, die feulgenpositive Substanz liegt zwischen den Ausbeulungen des Chromatoplasmas.

Literatur

- ACTON, ELIZABETH: Observations on the cytology of the Chroococcaceae. Ann. of Bot. **28**, 433 (1914). — DREWS, G., u. W. NIKLOWITZ: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. II. Zentralplasma und granuläre Einschlüsse von *Phormidium uncinatum*. Arch. Mikrobiol. **24**, 147 (1956). — ELBERS, P. F., K. MINNAERT and J. B. THOMAS: Submicroscopic structure of some chloroplasts. Acta Bot. Neerl. **6**, 345 (1957). — GEITLER, L.: Schizophyceae. In: Linsbauers Handb. d. Pflanzenanatomie, Abt. II, Bd. IV/1, Berlin 1936. — Normale und pathologische Anatomie der Zelle. Handb. d. Pflanzenphysiologie, Bd. 1, 1955. — NIKLOWITZ, W., u. G. DREWS: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. I. Untersuchungen zur Substruktur von *Phormidium uncinatum* Gom. Arch. Mikrobiol. **24**, 134 (1956). — IV. Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Substruktur einiger Hormogonales. Arch. Mikrobiol. **27**, 150 (1957).

(From the U.S. Naval Postgraduate School, Monterey, Calif.)

On the Interplay of Environmental Factors Affecting Taxis and Motility in *Rhodospirillum rubrum*

By

RODERICK K. CLAYTON*

With 11 Figures in the text

(*Ein eingangen am 11. Oktober 1957*)

When reviewing the literature describing tropisms and taxes in micro-organisms, the reader is struck by the complex and unpredictable ways in which environmental factors modify the responses to external stimuli (see MAINX 1929). A common reaction to this discovery is a determination to conduct simple, carefully controlled experiments, through which the response to a given stimulus, under rigidly specified conditions, can be noted. While this approach is invaluable in testing hypotheses, it is not conducive to their initial formulation, since the information obtained is fragmentary. The perception of generalizations might better be achieved by studying carefully the interplay of several variables in a fairly complicated situation.

An amply complex situation is encountered when one studies tactic responses in *Rhodospirillum rubrum*. This organism responds tactically¹ to changes in illumination and in the concentrations of numerous chemicals (notably oxygen); moreover, the response to a change in one environmental factor is often modified by the presence (or magnitude) of another factor. The rich variety of tactic phenomena in *R. rubrum* can be linked (MANTEN 1948; CLAYTON 1955 b) to its metabolic versatility; the organism can grow either phototrophically or through an oxidative metabolism.

Our purpose in this paper is to describe observations of tactic responses in *Rhodospirillum rubrum* and to offer a working hypothesis correlating these observations.

Methods

A. Material

Rhodospirillum rubrum, strain S-1 (van Niel), was cultivated anaerobically, under illumination, in yeast extract (1%) plus tap water. Exponentially growing cultures were centrifuged, suspended, centrifuged, and resuspended to a density of

* Present Address: Microbiology Unit, Department of Biochemistry, Oxford University, England.

¹ The tactic response is a sudden reversal in the direction of swimming, occasioned by a change in the immediate environment of the organism.

about 1 mg. (dry weight) per ml. in distilled water containing the following concentrations of minerals: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.0, 0.01 M; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%; MgCl_2 0.05%; CaCl_2 0.02%; NaHCO_3 0.006 M. Endogenous metabolism was sufficient to ensure good motility in these suspensions, provided that the cells had access either to light or to air. Vigorous tactic responses were observed under appropriate conditions¹.

B. Some technical difficulties

Taxis was observed by noting the distribution of bacteria, in a dense suspension, in the neighborhood of an appropriate stimulating agent. To evaluate a pattern of distribution of bacteria, as seen with the unaided eye, one must take at least two factors into account, aside from the occurrence of tactic responses:

1. A decrease in motility will lead to a "trapping" effect which will produce a pattern suggestive of positive taxis: The cells will tend to congregate where their speed of swimming is reduced. Conversely, in a region where the speed of swimming is increased, the density of cells will be diminished. These phenomena will henceforth be termed, collectively, "the motility artefact".

2. In a region where a reagent is diffusing rapidly from its source, the cells will be pushed outward along the advancing front of the zone of diffusion, through a transfer of momentum from the diffusing molecules to the cells. The appearance of the pattern will suggest a strong negative taxis: a clear zone with a sharp, dense boundary. This effect, henceforth termed "the diffusion artefact", is exhibited convincingly in preparations in which the cells have been rendered immotile through the use of a suitable poison.

The author has described in an earlier paper (CLAYTON 1957) a semi-quantitative investigation of these phenomena; for our present purposes the following facts should be borne in mind: In chemotaxis experiments, using readily soluble reagents, the diffusion artefact predominates during the early phases of evolution of the pattern. It is negligible when the pattern has become relatively stationary (in general, after the first minute of development, or when the apparent boundary of the "diffusion zone" has become greater than 1 cm in diameter). The effect is not noticeable when sparingly soluble reagents are used. Restricting our attention to well-developed, slowly changing patterns (these alone will be reported in the remainder of this paper), a distribution suggesting positive chemotaxis can only be interpreted as such, with confidence, if the

¹ In an earlier publication (CLAYTON 1955b) it was reported that under conditions which preclude exogenous metabolism, few tactic responses occur. It appears now that the author was misled by the poor motility of the cells, under the conditions then prevailing. The vigor of tactic responses was judged by viewing congregations of bacteria with the unaided eye, and not through the microscopic observation of single cells.

motility is unaltered or increased by the presence of the reagent. A congregation of cells in the vicinity of the reagent, occasioned by a positive chemotaxis, cannot be distinguished from one which is caused by a suppression of motility, except through careful microscopic observation. Similarly, an observation of negative chemotaxis will be regarded as valid only if the reagent diminishes the motility or leaves it unaltered.

It is likely that many reports, in the literature, of positive osmotaxis (a non-specific chemotactic attraction toward ions) are in reality descriptions of the motility artefact. Such reports have been offered by MANABU (1897), KNIEP (1906) and many others; for a comprehensive bibliography see LINKS (1955).

KNIEP observed that with *Rhodospirillum rubrum* certain pairs of ions (Cl^- and $\text{SO}_4^{=}$; K^+ and Ca^{++}) acted independently, or additively, and concluded that independent mechanisms for chemotaxis were involved; he may have been dealing with independent mechanisms for a suppression of motility. PRINGSHEIM and MAINX (1926) report that *Polytoma uvella* displays no osmotaxis. More significantly, FECHNER (1915), observing the chemotactic responses of individual specimens of *Oscillatoria*, found nothing but negative responses (withdrawal from the reagent) toward salts, acids, bases, and organic compounds. METZNER (1920) reports, for *Spirillum volutans* exposed to crystals of NaCl, the immediate development of a pattern of negative chemotaxis having a dense "positive" boundary; in all probability this was an example of the diffusion artefact.

To eliminate these artefacts, one must observe the responses of individual bacteria to chemical stimuli which are applied suddenly. The technique of DE ROBERTIS and PELUFFO (1951), in which reagent and cells are separated by a cellophane membrane, might be turned to this purpose.

C. Aerotaxis observations

A suspension of *R. rubrum*, prepared as described earlier, was mounted in a disc-shaped chamber, 1 cm. in diameter and $\frac{1}{2}$ mm. thick, formed by combining a microscope slide, a glass spacing ring, and a cover glass. The ensemble was sealed together with 50% vaseline+50% lanolin to exclude air and prevent evaporation. A reagent, whose effect on aerotaxis was to be tested, was incorporated in the suspension medium (described in the foregoing section) at a concentration of 0.01 M.

The preparation was placed in the dark for 30 minutes to one hour; during this time any dissolved oxygen was reduced through respiration. This treatment was followed by illumination (two feet from a 100 watt lamp) for 10 minutes to ensure motility of the cells. One edge of the cover glass was then pried up gently until a small air bubble entered the preparation; the development of a pattern of accumulation or withdrawal in the vicinity of the bubble was observed under various conditions of illumination. Phototaxis was observed by illuminating part of the preparation and noting the distribution of bacteria near the light-dark boundary.

D. Chemotaxis observations

Chemotaxis¹ was observed by the traditional method of placing a reagent locally inside a suspension of bacteria under a raised cover glass, and noting the distribution of cells as the reagent diffused away from its original site. A cover glass was supported $\frac{1}{2}$ mm above a microscope slide by bits of wax; the suspension of bacteria

¹ Throughout this paper, "chemotaxis" will denote tactic responses to substances other than oxygen.

was pipetted into the intervening space. The preparation was flooded with suspension around the cover glass, to allow for evaporation. A regime of about 30 minutes' darkness followed by ten minutes' illumination was imposed, to ensure anaerobicity and motility. At the end of this time the "flooded" part of the preparation, outside the cover glass, had dried up. Now a few crystals of a solid reagent were placed in the center of the preparation, being carried on the tip of a fine glass rod dipped in vaseline. In the case of a liquid reagent, the substance was placed in a capillary tube, flared at the ends and sealed with wax; this tube was placed under the cover glass, with its ends protruding, before the bacterial suspension was added. At the appropriate time the tube was broken at its center (within the suspension) by means of a glass rod. A little pressure on the wax, sealing one flared end, forced a droplet of the reagent out of the broken end, into the suspension.

Following introduction of the reagent, the preparation was viewed under dim light (the meaning of "dim" will be discussed under *Results; Aerotaxis*, p. 197); as the reagent diffused outward, the evolution of a pattern of distribution of bacteria could be studied. The effect of oxygen upon the response to the reagent could be observed by noting changes in the pattern at the periphery of

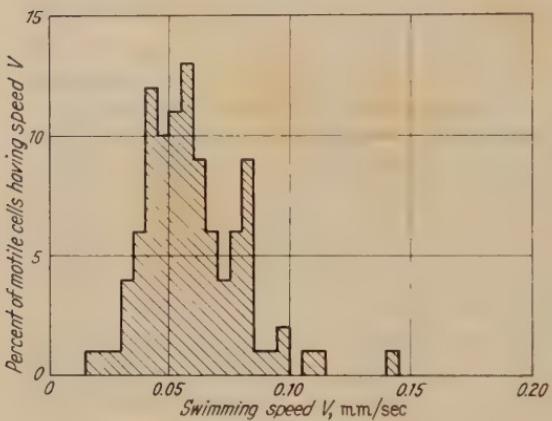


Fig. 1. Distribution in speeds of 100 motile *Rhodospirillum rubrum*, observed microscopically

the cover glass; conversely the effect of the reagent upon aerotaxis could be seen in the peripheral parts of the preparation (although not as clearly as in the preparations described in the foregoing section). The effect of light upon chemotaxis, and of the reagent upon phototaxis, could be studied by raising the level of illumination and by illuminating half of the preparation and observing any changes at the light-dark boundary.

E. Observation of motility

The degree of motility of cells in the preparations just described could be gauged roughly through microscopic observation. Owing to the density of the suspensions, it was impossible to follow individual organisms or to estimate, even crudely, the fraction of cells which were motile. The observation of motility was therefore supplemented, in some cases, by a separate experiment, conducted as follows: A suspension of cells was prepared in the manner already described. A drop of this suspension was added to 1 ml of clear suspension medium, in which the reagent under study was, in most cases, incorporated at a concentration of 0.5%. This concentration was calculated to be greater than that prevailing in the "chemotaxis" preparations, at least in those regions of the latter from which conclusions were drawn. A drop of the diluted suspension, containing a reagent, was examined microscopically; an average speed of swimming was obtained by timing twenty individual cells as they swam from the center to the edge of the field of view (a distance of 0.2 mm). This observation was repeated ten minutes later. The distribution in speeds of 100 individual cells, as measured in one experiment, is shown in Fig. 1.

Results

A. Motility

Information regarding motility, as observed in aerotaxis and chemotaxis preparations, is presented in Table 1. The results of more careful measurements with diluted suspensions are shown in Tables 2a, b, c, d, and e. Each of these latter tables contains the data from a separate experimental session.

*Table 1. Effects of reagents on the motility of *Rhodospirillum rubrum*, as observed in dense suspensions*

Motility retarded slightly	Motility retarded strongly	Motility abolished
	tetrazolium blue	FeSO ₄
Curare	ethanol	Na ₂ S
	ascorbic acid	KCN
Na ₂ HPO ₄	citric acid	Na ₂ O ₂
	KHSO ₄	NaNO ₂
	KH ₂ PO ₄	NaHSO ₃
		Na-p-chloromercuribenzoate
		phenylmercuric acetate
		Na iodoacetate
		2,4-dinitrophenol
		quinone
		FeCl ₃

*Table 2a. Effects of reagents on the motility of *Rhodospirillum rubrum* (see text)*

Reagent	Concentration	Mean swimming speed, mm/sec	Remarks
None	—	0.056	
None; bicarbonate omitted from suspension medium	—	0.045	0.058 mm/sec after 1 hour
Na butyrate; no bicarbonate	0.01 M	0.046	
Na malate	0.01 M	0.060	
L-cysteine	0.5%	0.062	0.059 after 1 hour
L-cystine	sat.; < 0.5%	0.057	
Na ₂ HPO ₄	0.5%	0.057	0.040 after 10 min; immotile after 1 hour. Frequent spontaneous reversals (about one every 2 sec)
Hydroquinone (not purified)	0.5%	0.015	Immotile after 10 min. Brown color, suggesting quinone, develops
Quinone (not purified)	0.5%	0	Immotile
2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride	0.5%	0.040	Immotile after 10 min
Tetrazolium blue	sat.; < 0.5%	0	Immotile

Table 2b. See text

Reagent	Concentration	Mean swimming speed, mm/sec
None	—	0.052
None; bicarbonate omitted	—	0.046
L-cysteine	0.5%	0.056
Arginine	0.5%	0.056
Creatine	0.5%	0.052
Yeast extract	1.0%	0.053
Adenosine diphosphate .	Sat.; < 0.5%	0.054
Adenosine triphosphate .	0.5%	0.053

Table 2c. See text

Reagent (0.5%)	Mean swimming speed mm/sec	Remarks
None	0.058	
Homocysteine	0.063	
Glutathione	0.048	Many immotile; a few very fast
Methionine	0.060	
Alanine	0.057	
Phenylalanine	0.057	
Serine	0.060	Many immotile after 10 min
Curare	0.053	Frequent slowing, starting and stopping, and reversals
Ethanol (1.0%)	0.045	
D-lysergic acid dimethylamide tartrate (0.01%) .	< 0.02	Frequent stops and reversals. Many immotile
Acetylcholine	0.025	Nearly all immotile after 10 min
Eserine sulfate	0.054	

Table 2d. See text

Reagent (0.5%)	Mean swimming speed mm/sec	Remarks
None	0.037	
NaCl	0.027	Erratic course and speed
MgCl ₂	0.034	Erratic course and speed
CaCl ₂	0.02	Many immotile
NaNO ₃	0.02	Frequent reversals
KClO ₃	0.035	
Na ascorbate	0.027	Many immotile
Na fluoroacetate	0.032	Many immotile
NH ₂ OH · HCl	<.02	Nearly all immotile
Adrenaline	0.042	Reagent increases fraction of cells which are motile

Table 2e. See text

Reagent (0.5%)	Mean swimming speed. mm/sec	Remarks
None	0.058	pH 7.5, rather than 7.0, in all cases cited in this table
NaCl	< 0.01	
KCl	< 0.01	
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	0.053	Reagent adjusted to pH 7.5
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	0.056	Reagent adjusted to pH 7.5
L-cysteine	0.062	
None	0.061	Suspension medium contained no Na ⁺ ; Na ₂ HPO ₄ was replaced with K ₂ HPO ₄
NaCl	< 0.01	Suspension medium contained no Na ⁺ ; Na ₂ HPO ₄ was replaced with K ₂ HPO ₄ ;
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	0.058	Suspension medium contained no Na ⁺ ; Na ₂ HPO ₄ was replaced with K ₂ HPO ₄ ; reagent adjusted to pH 7.5
None	0.060	Suspension medium contained no K ⁺ ; KH ₂ PO ₄ was replaced by NaH ₂ PO ₄
KCl	< 0.01	Suspension medium contained no K ⁺ ; KH ₂ PO ₄ was replaced by NaH ₂ PO ₄
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	0.060	Suspension medium contained no K ⁺ ; KH ₂ PO ₄ was replaced by NaH ₂ PO ₄ ; reagent adjusted to pH 7.5

The results shown in Tables 2a—e differ in some respects from those of Table 1 (among the latter should be included those cases in which a reagent had no obvious effect on motility, as judged in dense suspensions, and hence was not listed in the Table). Thus, for example, the suppression of motility by NaCl (Tables 2d, e) was not detected in dense suspensions, because of the much larger population under observation. Taking the measurements with diluted suspensions to be more reliable than the superficial observations of dense suspensions, we note the following effects (among others):

1. Motility is enhanced by sodium malate, cysteine, homocysteine, and adrenaline.
2. Motility is retarded by chloride ion, by the absence of bicarbonate, and by a variety of toxic substances, especially by thiol inhibitors.
3. Curare and lysergic acid induce erratic swimming; adrenaline arouses immotile cells.

Finally, the dependence of motility upon light and air should be mentioned. Cells which have been starved by prolonged incubation in the absence of a carbon source are immotile in the dark, under anaerobiosis. The feeble motility displayed by "fresh" cells under these conditions ceases after a few hours; it can be attributed to energy-yielding endogenous processes of the sort described for the green bacteria by LARSEN

(1953). A few seconds' exposure to light or to air restores vigorous motility; the speed of swimming in the absence of air rises with increasing light intensity to a maximum value equal to that in the presence of air. The light intensity which is saturating for motility appears to be roughly equal to that which is saturating for phototaxis or for photosynthesis.

We conclude that a pool of stored energy is not available for sustained motility; an immediate source of energy appears to be required.

B. Aerotaxis

The interpretation of "aerotaxis patterns", in the neighborhood of an air bubble, sometimes requires care because of a balance between the diffusion of oxygen into the preparation and its removal by the cells.

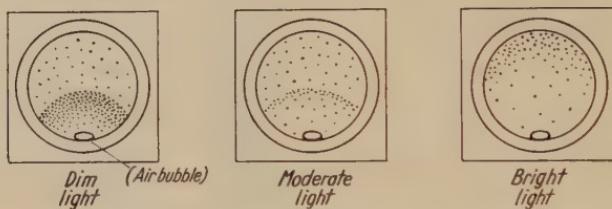


Fig. 2. Aerotaxis of *Rhodospirillum rubrum* suspended in a mineral medium, under three conditions of illumination. See text for details

Thus, a feeble aerotaxis observed with weakly respiring cells can be conspicuous because the pattern extends far into the preparation, while a strong aerotaxis coupled with vigorous respiration is sometimes hard to detect because the pattern is confined to a narrow border around the bubble. In our experiments this situation was not especially troublesome. The motility artefact was not a source of uncertainty in observations of aerotaxis, as the reader can verify by cross-checking the results of this section against those of the foregoing section (Results: Motility).

Aerotaxis in the absence of special reagents has been described elsewhere (CLAYTON 1955b); the patterns observed under various conditions of illumination are shown in Fig. 2. In darkness or in dim light a pattern of positive aerotaxis prevails; the density of cells is greatest at a well-defined boundary. The transition to bright light yields a "transitional" pattern in which the boundary alone remains dense; a low oxygen tension is preferred over greater and still lesser values. This micro-aerophilic behavior is commonly displayed by colorless spirilla (BEIJERINCK 1893) at all light intensities. In bright light the pattern formed by *R. rubrum* is one of negative aerotaxis; the extent of the pattern is greater than that of the positive pattern, and a sharp boundary is lacking. These patterns can be correlated with the metabolism of the bacteria

(CLAYTON 1955a). In dim light the cells engage mainly in respiration; in bright light respiration is suppressed and photosynthesis prevails. The transitional (microaerophilic) aerotaxis is displayed at a light intensity which is just saturating for photosynthesis; at this intensity respiration is inhibited but not wholly suppressed.

All further reference to bright light will denote an intensity sufficient to eliminate respiration; dim light will mean an intensity at which photosynthesis proceeds much more slowly than respiration. Phototaxis

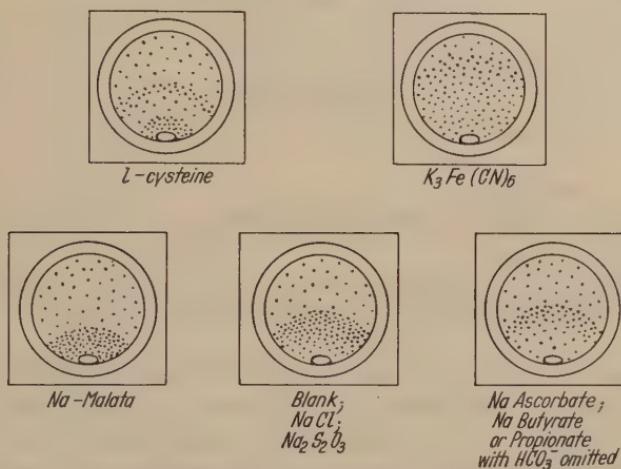


Fig. 3. Aerotaxis of *Rhodospirillum rubrum*, in dim light, in the presence of various reagents at concentrations of 0.01 M

patterns, produced by partial illumination of the preparations, developed only in the anaerobic region beyond the boundary of the aerotaxis pattern. This inhibition of phototaxis by air has been known since the time of ENGELMANN (1881).

We turn now to a description of aerotaxis as modified by certain chemicals. Neither the negative aerotaxis in bright light nor the transitional pattern in moderate light was modified by any of the chemicals added; we shall describe only the positive aerotaxis in dim light. This is portrayed in Fig. 3, for cells in the presence of the reagents listed in the figure (all at concentrations of 0.01 M). Only in one of the cases shown in Fig. 3 was motility retarded; in the presence of cysteine, two zones of congregation were observed. The denser, inner zone contained cells of reduced motility. It is possible that the combination of air and cysteine, in the presence of a dense suspension of cells, yielded a toxic substance (peroxide?). The more extensive pattern in the presence of ferricyanide suggests that the rate of removal of oxygen was diminished. Phototaxis was abolished by this reagent, but motility was apparently normal. In

the presence of 0.001 M NaCN (not illustrated), aerotaxis was suppressed, while phototaxis was not. The enhancement of positive aerotaxis in the presence of sodium malate, and its attenuation in a more reducing environment (butyrate or propionate, with bicarbonate omitted) should be noted.

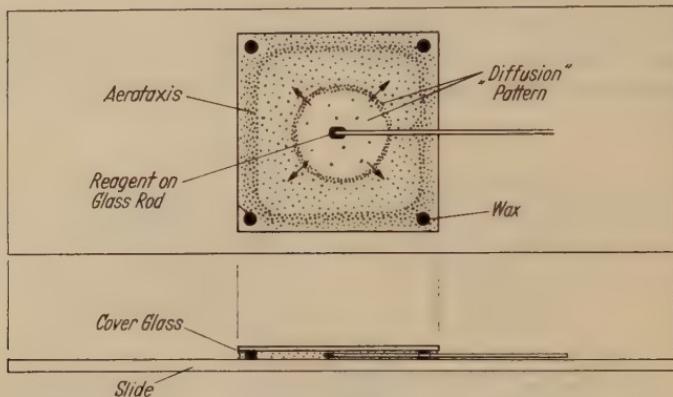


Fig. 4. Initial pattern in "chemotaxis" preparation (readily soluble solid reagent), showing the effects of diffusion of the reagent. See text for details

It is appropriate to reiterate here some findings reported earlier (CLAYTON 1955b): Methylene blue suppressed phototaxis at a concentration of $2 \cdot 10^{-4}$ M and aerotaxis at a concentration of 10^{-3} M; 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride suppressed phototaxis and aerotaxis at a

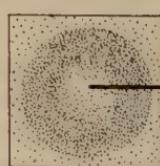
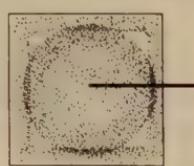
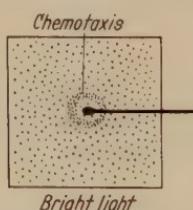
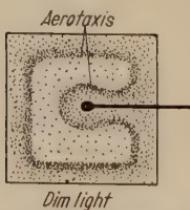


Fig. 5. Initial pattern in "chemotaxis" preparation (sparingly soluble reagent) showing the masking of chemotaxis by aerotaxis. See text

Fig. 6. Fully developed "positive chemotaxis" pattern with peripheral aerotaxis

concentration of 10^{-3} M. It is not known whether motility was abolished in these cases. The suppression of phototaxis and of aerotaxis could be correlated with a suppression of carbon assimilation via photosynthesis and respiration, respectively.

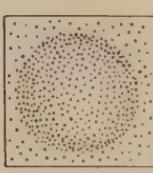
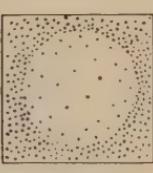
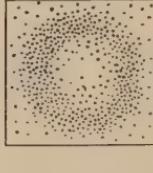
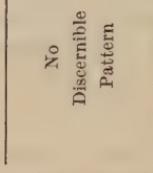
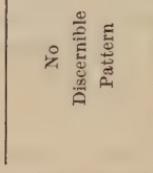
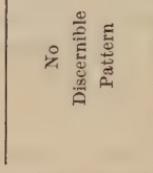
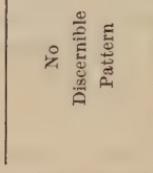
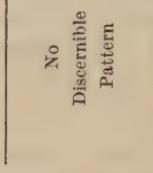
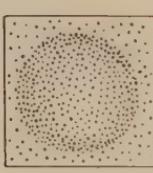
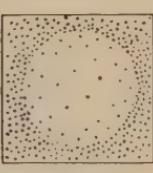
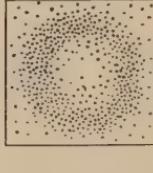
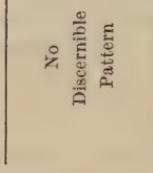
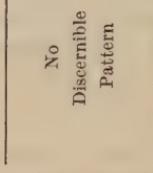
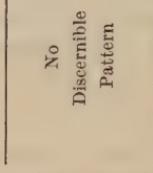
C. Chemotaxis

During the first few seconds after a readily soluble reagent was introduced into a chemotaxis preparation, the rapidly growing pattern had, in all cases, the appearance shown in Fig. 4. This pattern was caused by the diffusion artefact. The positive aerotaxis which appeared near the

edges of the preparation is also shown in Fig. 4. In the case of a poorly soluble reagent, the diffusion effect was not noticeable, and an aerotaxis, caused by air carried in with the reagent, was sometimes seen (Fig. 5a). This disturbing effect vanished after about two minutes; while present it could be "lifted" by illuminating the preparation more brightly (Fig. 5b).

Table 3. Behavior of *Rhodospirillum rubrum* in the presence of various reagents, with respect to chemotaxis and changes in motility (see text for details)

Pattern	Reagent	Effect on motility	Chemotaxis
strong positive (A)	L-cysteine, homocysteine, Na malate	increased	positive
	Na ₂ HPO ₄ , acetylcholine, Na ascorbate	decreased	?
	eserine sulfate	decr. slightly	?
moderate positive (A-B)	methionine	no change	positive
	Na succinate, NaHCO ₃ , Na Malonate	—	(probably pos. toward succin.).
	hydroquinone, Na fluoroacetate	decreased	?
slight positive (B)	NaCl, NaNO ₂ , CaCl ₂ , KCl, NH ₂ OH · HCl	decreased	?
	Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na or K persulfate, Na or K ferricyanide, Na or K ferrocyanide	—	?
slight negative (B-C)	MgCl ₂ , KClO ₃ , alanine	no change	negative
	NaNO ₃	decreased	negative
	serine	decr. slightly?	negative
	glycine	—	?
negative (C)	L-cystine, phenylalanine	no change	negative
	histamine	—	? (probably neg.)
strong negative (D)	Na ₂ O ₂ , KCN, Na ₂ HPO ₄ , KHSO ₄ , curare, 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride	decreased	negative
	tetrazolium blue, ethanol	decreased	negative
	phenyl mercuric acetate, Na-p-chloromercuribenzoate, Na iodoacetate, 2,4-dinitrophenol, quinone, FeCl ₃	abolished	negative
pos. with neg. core, indistinct boundary (E)	glutathione, Na ₂ S, ascorbic acid, FeSO ₄ , citric acid, KH ₂ PO ₄ , NaHSO ₃	decreased	?

A	B	C	D	Immotile		E	F
				No Discernible Pattern	Fresh suspension Medium		
							
I-Cysteine ^{1,7,9} Homocysteine ¹ Na. Malate ^{3,5} Na. Ascorbate Na ₂ HPO ₂ Acetylcholine Eserine Sulfate	NaCl CaCl ₂ ^a Na ₂ SO ₄ NaNO ₂ Na ₂ S ₂ O ₃ NH ₄ OH · HCl ⁴ Na ₂ S ₂ O ₈ K ₂ S ₂ O ₈ Na ₂ Fe(CN) ₆ ^a K ₃ Fe(CN) ₆ ^a Na ₃ Fe(CN) ₆ ^a K ₄ Fe(CN) ₆ ^a	Cystine Phenylalanine Histidine Curare Na ₂ HPO ₄ Na ₂ O ₂ KHSO ₄ KCN Triphenyl tetrazolium chloride	Phenymercuric acetate ^a p-chloromercuri- benzoate ^a Na Iodoacetate ^a 2,4-dinitrophenol ^a Quinone ^a FeCl ₃ ^{a,b} Tetrazolium Blue Ethanol				
							
				Hydroquinone ^a Methionine Na-Succinate Na-Malonate Na-Fluoroacetate NaHCO ₃	MgCl ₂ NaNO ₂ KClO ₃ Glycine Alanine Serine		

¹ Aerotaxis weakened in presence of reagent² Aerotaxis abolished in presence of reagent³ Aerotaxis enhanced in presence of reagent⁴ Phototaxis abolished in presence of reagent⁵ Phototaxis enhanced in presence of reagent

- ^a Cells strictly immotile in presence of reagent
- ^b "Positive" effect enhanced in peripheral (aerobic) zone
- ^c Pattern obscured by precipitate
- ^d Reagent applied as saturated solution, both fresh and thoroughly aerated, as well as in solid form.

- ^a Cells strictly immotile in presence of reagent
- ^b "Positive" effect enhanced in peripheral (aerobic) zone
- ^c Pattern obscured by precipitate
- ^d Reagent applied as saturated solution, both fresh and thoroughly aerated, as well as in solid form.

Fig. 7. Patterns of distribution of *Rhodospirillum rubrum* in the presence of various reagents (see text)

The relatively stationary patterns attained after about one minute fell into five major classifications; a typical "positive" pattern is portrayed in Fig. 6, together with the usual peripheral aerotaxis. The five major types of mature patterns are shown in Fig. 7, where for clarity the peripheral aerotaxis and some parts of the apparatus have been omitted. In this figure are tabulated the reagents producing the various types of pattern (and some "hybrid" patterns), and a description of any special effects which were observed. Taking the motility artefact into account, we arrive at the conclusions listed in Table 3. A question mark under "chemotaxis" means that an unresolved uncertainty existed because of the motility artefact.

D. Summary of principal results

The main results of this and earlier investigations (CLAYTON 1955b) are summarized in Table 4, together with a few remarks which suggest generalizations. Effects of "physiological" ions are excluded; their roles with regard to taxis did not become clear in these studies. A more careful study, such as that of HALLDAL (1957) on the phototaxis of *Platymonas* in the presence of Mg and Ca ions, would be required to elucidate the effects of these ions.

Discussion

A. Relations between taxis and metabolism

Efforts to understand the mechanisms involved in taxis in *R. rubrum* have been guided by two facts.

First, tactic responses and metabolic activities are related: an environmental change which elicits a taxis also leads to a decrease in metabolic activity. Examples of this correlation are found in the similarity of action spectra for phototaxis and for photosynthesis (MANTEN 1948, CLAYTON 1953a), in the parallelism between saturating light intensities for these processes (CLAYTON 1953b and 1955b, THOMAS and NIJENHUIS 1950), and in the relation between aerotaxis and metabolism (CLAYTON 1955b).

Second, the phototaxis of *R. rubrum* displays properties classically associated with excitable systems such as nerve (CLAYTON 1953c): an "all-or-none" response, accommodation, refractoriness, rhythmicity, reciprocity of strength and duration of a liminal stimulus, and summation of subliminal stimuli. The behavior in these respects bears a close quantitative resemblance to that of nerve. An outstanding characteristic of nerve is its amplifying ability: a large amount of stored energy is released in a response triggered by an energetically small stimulus. One may then seek, in *R. rubrum*, an internal "trigger" which is brought into play through an environmental change, and which initiates a process of

amplification culminating in a tactic response. In nerve the trigger can be a local electric current which depolarizes the axon membrane. By analogy, a trigger in *R. rubrum* might be a local fluctuation in oxidation

Table 4. Summary of principal results pertaining to taxis in *R. rubrum*

Taxis	Inducing agent	Reagents or conditions augmenting taxis	Reagents or conditions inhibiting taxis	Reagents or conditions abolishing taxis	Remarks
Positive phototaxis	Light	Salts of simple organic acids (oxidizable) substrates		Air; Ferricyanide; Hydroxylamine	Negative phototaxis is not observed
Positive aerotaxis	Oxygen	Na Malate	Cysteine; Homocysteine; Na Ascorbate; Na Butyrate or Propionate with no HCO_3^- ; moderate illumination	NaCN; Glutathione; Hydroquinone; Na_2S	Inhibitors of aerotaxis are, in general, reducing substances
Positive chemotaxis	Cysteine Homocysteine Methionine Na Malate	Reducing substances			
Negative chemotaxis	Alanine Phenylalanine Serine Cystine KClO_3 NaNO_3 Quinone FeCl_3 TTC* TB** Ethanol Curare 2,4-dinitrophenol KCN Na_2O_2 Na_2HPO_4 KHSO_4 Phenylmercuric acetate p-chloromercuribenzoate Na Iodoacetate	Compare positive chemotaxis with cysteine and homocysteine		Oxidizing substances	
		"Poisons"		Extremes of pH	
		Thiol inhibitors			

Negative chemotaxis is usually accompanied by a strong inhibition of motility

* Triphenyl tetrazolium chloride.

** Tetrazolium blue.

potential, caused by the transient accumulation of an oxidizing or reducing substance.

Combining the considerations of the last two paragraphs, the author was led (CLAYTON 1955 b) to the following extension of a more restricted hypothesis proposed by MANTEN in 1948: "A tactic response of *R. rubrum* is mediated by a transient disturbance which accompanies a decrease in the rate of (respiratory plus photosynthetic) metabolism". The immediate problem, then, is to identify a transient internal change which accompanies a tactic response in every case, and which is less pronounced when taxis is inhibited and vice versa. Internal changes which are associated with the metabolism of *R. rubrum* can be visualized through a study of Fig. 8, which portrays in condensed form the currently accepted pathways of photosynthesis and respiration in this organism. In this figure the cycle $E \rightleftharpoons EH_2$ denotes enzyme systems involved in reductions peculiar to photosynthesis, especially the fixation of CO_2 via the pentose cycle. The cycle $C \rightleftharpoons CH_2$ represents the entire electron transport system, from the dehydrogenase interacting with H_2A to the terminal oxidase which transfers electrons to O_2 or to the oxidizing entity (OH). Some parts of this system appear to be common to photosynthesis and respiration. Substrates (H_2O) suitable for one of these processes will serve also in the other. The syntheses yielding carbohydrate, lipid, and protein also involve pathways common to both modes of metabolism. Among these pathways one can expect to find processes of the sort shown in Fig. 8 c.

If we restrict ourselves to pathways common to photosynthesis and respiration (as we must, to account for phototaxis and aerotaxis), we find two major oxidation-reduction situations. The first of these is represented in Fig. 8 as $C \rightleftharpoons CH_2$; let us see whether taxis can be correlated with a change in the concentration of C (or of CH_2). Phototaxis is a response to an abrupt decrease in illumination; such a decrease would reduce, at least momentarily, the rate of formation of (OH) and hence the concentration of C . Thus phototaxis is correlated with a decrease in C (or an increase in CH_2):

$Phototaxis \sim Decrease\ in\ illumination \sim Decrease\ in\ flux\ of\ (OH) \sim Decrease\ in\ C.$

Similarly, for the positive aerotaxis in darkness, which is a response to a decrease in oxygen tension:

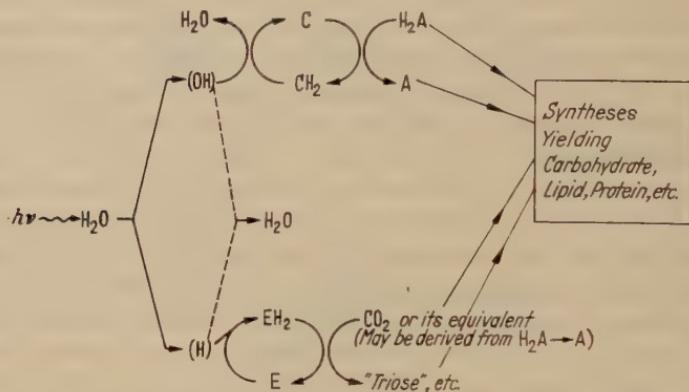
$Aerotaxis \sim Decrease\ in\ O_2 \sim Decrease\ in\ C.$

For the positive chemotaxis toward reducing substances, and especially toward H -donor substrates (" H_2A " in Fig. 8) such as malate, we must write:

$Chemotaxis \sim Decrease\ in\ reducing\ agent\ or\ H\text{-}\ donor \sim Increase\ in\ C.$
Thus taxis cannot be correlated with a change in the level of oxidation in the electron-transport system. It is also difficult to understand, in

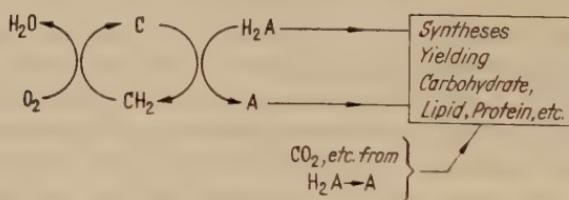
these terms, the negative aerotaxis in the light and the negative chemotaxis toward extremes of pH and toward miscellaneous poisons.

Having ruled out the system $C \rightleftharpoons CH_2$, let us examine the second generalized oxidation-reduction system which is common to respiration

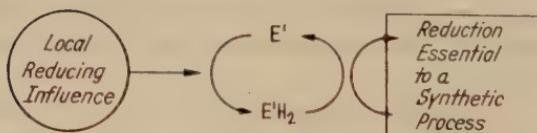


H_2A = Organic H-Donor substrate: Malate, Acetate, etc. (OH) = Hypothetical oxidizing entity arising from photolysis of H_2O . (H) = Hypothetical reducing entity arising from photolysis of H_2O .

a) Photosynthesis



b) Respiration



c) Example of an oxidation-reduction cycle common to the anabolic pathways of photosynthesis and respiration

Fig. 8. Outline of metabolic pathways in *Rhodospirillum rubrum* (see text)

and photosynthesis: $E' \rightleftharpoons E'H_2$ in Fig. 8. The effects of oxygen and of illumination upon the concentrations of E' and $E'H_2$ are more difficult to predict, but the following relationships are likely to prevail:

$Phototaxis \sim Decrease \text{ in illumination} \sim Decrease \text{ in flux of } (H) \sim Decrease \text{ in } E'H_2$.

Positive aerotaxis (dark) \sim Decrease in $O_2 \sim$ Increase in $E'H_2$.

Negative chemotaxis \sim Increase in various poisons and "unphysiological" conditions \sim Various effects on $E'H_2$.

This sort of correlation, then, also seems unsatisfactory.

Another possibility is to correlate a tactic response with a decrease in the rate of turnover of a process such as that shown in Fig. 8c, and hence with a decrease in the concentration of a compound which is synthesized as a result of such activity. To speak in general terms, one might associate a tactic response with a decrease in the rate of anabolic activity, or alternatively with a decrease in the rate at which energy-rich substances are synthesized. It should be kept in mind that a positive taxis toward some agent is a response elicited by a decrease in the strength of the agent. To correlate a tactic response with a decrease in the rate of a synthesis is the same as to say, "a pattern of positive taxis is aroused by an agent which accelerates the synthesis, and vice versa".

Through this sort of correlation, most of our observations can be understood: positive phototaxis (light permits photosynthesis), positive aerotaxis in darkness (air permits syntheses through respiration), and the augmentation of these by substrates such as malate. Similarly we understand the positive chemotaxis toward malate, and the negative chemotaxis toward poisons and extremes of pH. The abolition of aerotaxis by cyanide (which suppresses respiration) is to be expected, as is the abolition of phototaxis by hydroxylamine, which suppresses photosynthesis.

If the rate of our hypothetical synthesis is maximal in the presence of air, it will not be influenced further by fluctuations of light intensity. Thus the suppression of phototaxis by air is understandable. Conversely, if moderate illumination permits a synthesis whose rate is maximal and independent of oxygen tension, one can understand the suppression of positive aerotaxis by light.

The negative aerotaxis in bright light can best be understood as a chemotaxis toward intracellular products of photosensitized oxidations. This view is supported by the experiments of METZNER (1920), who found that the colorless *Spirillum volutans* becomes negatively phototactic when impregnated with eosin.

Thiol inhibitors were found to be especially powerful in eliciting negative chemotaxis. This would indicate that the synthesis associated with taxis, or the activity of the system synthesized, requires the cooperation of sulfhydryl groups. The broad identification of oxidizing agents as negative chemotactica, and of reducing agents as positive chemotactica, can then be understood in terms of oxidation or protection of SH-groups. In particular, the strong positive chemotaxis toward cysteine and homocysteine is to be expected.

Thus the bulk of the data summarized in Table 4 are consistent with the following hypothesis:

Taxis in the purple bacteria is mediated through the development of an excitatory state which is transmitted to the locomotor areas, causing a coordinated motor response. The development of excitation is triggered by a decrease in the concentration of a compound whose rate of synthesis parallels the rates of anabolic activities which support growth. The synthesis or the activity of this compound requires the cooperation of sulphydryl groups.

The few remaining observations listed in Table 4, which we have not discussed in this section, neither support nor contradict this hypothesis.

B. The hypothesis of Links (1955)

The evolution of the foregoing hypothesis has been guided in part by the tacit assumption that in taxis, as in other examples of excitability, an enormous amplification of energy stands between the stimulus and the response. This appears not to be true, as the following calculations show:

The "zero threshold" illumination¹ for phototaxis in *R. rubrum* is about five quanta per square micron per second, at a wave length of 890 m μ (CLAYTON 1953a); this wave length corresponds to the "bacteriochlorophyll peak" in the action spectrum for phototaxis. This intensity affords a rather sluggish motility; about

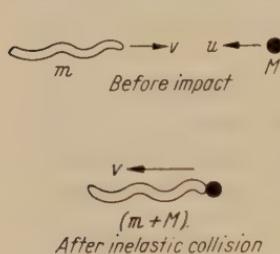


Fig. 9. Explanation in text

0.01 mm/sec. The cross-section of an average cell is about 20 square microns; at 890 m μ about 30% of the light incident on a single specimen of *R. rubrum* is absorbed (DUYSENS 1952). Thus about 30 quanta are absorbed per second by one cell at the "zero threshold" intensity; the corresponding energy is 0.6×10^{-10} /erg/sec. The energy expended by a cell in swimming can be estimated, using Stokes' formula for the viscous force opposing the movement of a sphere: $f = 6\pi\eta rv$, where v is the speed of the sphere, r is its radius, and η is the coefficient of viscosity of the medium. Using $r = 2$ microns (a conservative value, to allow for the non-spherical shape), $v = 0.01$ mm/sec, and $\eta = 1$ centipoise or 0.01 egs units, the rate of doing work, fv , is 0.4×10^{-10} /erg/sec. Thus our rough calculations give concordant orders of magnitude for the influx and expenditure of energy.

The energy expended in a tactic response, over and above that required simply to maintain motility, can be estimated conservatively by computing the loss of energy in an inelastic collision which is sufficient to reverse the direction of motion of the cell without altering its speed (Fig. 9). If the cell is of mass m and speed v , and the particle delivering the impact is of mass M , the loss of energy is $2mv^2(1+m/M)$. Making the conservative choice $m = 1000 M$ (perhaps the appropriate ratio is that

¹ Zero threshold is defined as the light intensity which is barely distinguished from total darkness, as judged by the occurrence of a tactic response when the light is suddenly replaced by darkness.

of the masses of cell body and flagella), we calculate, for a cell of mass $m = 30 \times 10^{-12}$ grams (corresponding to a volume of $30 \mu^3$) and speed $v = 0.01$ mm/sec, a loss of energy amounting to 0.6×10^{-13} erg. The energy of one quantum at wave length $890 \text{ m}\mu$ is 2×10^{-12} erg. Thus a single quantum of light, the least amount which could be involved in initiating a phototactic response, contains much more energy than is expended in the response. Clearly, an amplifying mechanism is not necessary on energetic grounds.

Having dismissed the need for an amplifier, we might ask ourselves whether the complicated system expressed in our hypothesis need be invoked. A simpler possibility then comes to mind: that a tactic response is related to a decrease in the rate at which energy is made available to the locomotor apparatus of the cell. In other words, the trigger for taxis might be an abrupt decrease in the concentration of ATP (or an equivalent substance) in the locomotor area. This view is made plausible by the experiments of HOFFMAN-BERLING (1955), which reveal that the coordinated movement of a flagellum, involving alternate contraction and relaxation in its fibrils, can be regulated simply by the steady-state concentration of ATP in the flagellum: Flagella of spermatozoa and trypanosomes, extracted with glycerol-water, undulate in the presence of ATP; the frequency of undulation rises with the concentration of ATP. This behaviour is displayed by pieces of flagella, bereft of external membranes.

The better to evaluate this simpler hypothesis, we shall insert here a brief review (which can be omitted by the reader who desires less detail and greater continuity) of our state of knowledge regarding the physiology of bacterial flagella.

The external contours of bacterial flagella suggest the structure of a double helix (DE ROBERTIS and FRANCHI 1951; LABAW and MOSLEY 1954). Flagella appear to be composed of protein fibrils, similar to myosin (WEIBULL 1951; ASTBURY et al. 1955), surrounded by a membranous sheath (DE ROBERTIS and FRANCHI 1951). The amounts of phosphate and carbohydrate in bacterial flagella are small (WEIBULL 1951). While the flagella of algae and fungi have been found to exhibit an arrangement, suggestive of an electric commutator, in which nine fibrils surround two others (MANTON et al. 1952), no such organization has been seen in bacterial flagella (BRAUN 1956).

The preponderance of evidence suggests that adenosine triphosphate is the immediate source of energy for the contraction of flagellar fibrils as well as of myosin. This view is expressed unequivocally by WEBER (1955), although some evidence to the contrary, based on a failure to detect ATP slitting immediately after the contraction of muscle, has been presented by FLECKENSTEIN et al. (1954) and by MOMMAERTS (1954). These negative findings have been discussed by SZENT-GYÖRGYI (1955). LARDY, HANSEN and PHILLIPS (1945) report that motility and ATP synthesis in bull spermatozoa can be coupled either with respiration or with glycolysis. TIBBS (1957) has measured the rate of splitting of ATP in suspensions of *Polytoma* flagella; he reports that the ATP which exists naturally in the flagella is cleaved rapidly enough to provide energy at a rate about fifteen times that required for motility.

The involvement of sulphhydryl groups in the ATP-induced contraction of muscle, the suppression of muscular contraction by thiol inhibitors, and the removal of this inhibition by sulphhydryl compounds have been observed many times: see BARRON and SINGER 1945, BAILEY and PERRY 1947, and HOFFMANN-BERLING 1954, among other. The most powerful inhibitors are mercaptide-forming agents such as phenyl mercuric acetate; cysteine and dithiopropanol (BAL) are excellent reactivating agents. DE ROBERTIS and PELUFFO (1951) have observed that the motility of *Proteus vulgaris* is enhanced by ATP and inhibited by thiol inhibitors; the inhibition is removed by cysteine and glutathione. HAYASHI (1955) reports that the ATP-induced contraction of myosin is inhibited by oxidized ascorbic acid, the inhibition being reversed by reduced ascorbic acid and by cysteine. He suggests that contraction could be regulated *in vivo* by redox systems.

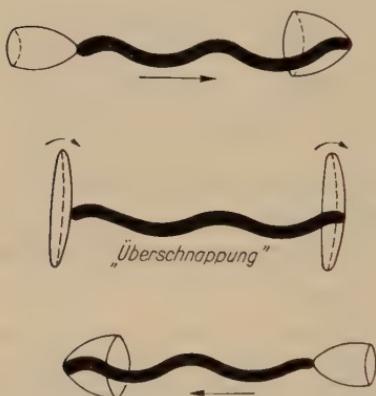


Fig. 10

Fig. 10. Movements of spirilla, showing reversal of swimming and of flagellar orientation, as described by BUDER (1915) and by METZNER (1920)

Fig. 11. Mechanical system which simulates the "Überschnappung" of a flagellum. *a* Position of rod, pivoted at p, is maintained by springs A, B, and C. *b* "Überschnappung": Spring C (not shown) relaxes temporarily; rod changes position under the influence of Spring A. *c* Spring C recovers its tension in time to hold rod in new position of equilibrium

The movements of flagella during the swimming and taxis of spirilla, as described by BUDER (1915) and by METZNER (1920), are portrayed in Fig. 10. The change in orientation of the flagella, leading to a reversal of swimming direction, is described by BUDER as an *Überschnappung*. While it is premature to formulate a mechanism whereby a transient decrease in the contractile activity of flagella can lead to a tactic response, it is perhaps worth while to point out that a suitable model can easily be conceived. Such a model, demonstrating the *Überschnappung* of a rod held by springs, is illustrated in Fig. 11. The rod, pivoted at P, snaps over during a temporary failure of spring "C".

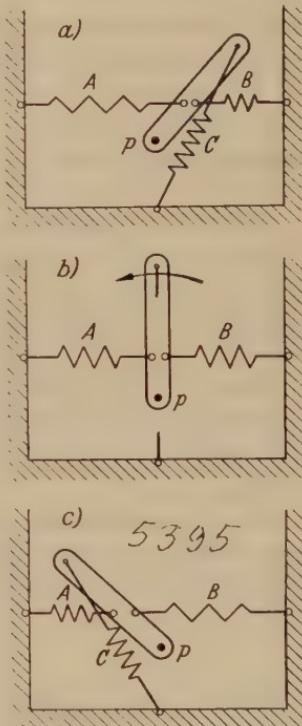


Fig. 11

In the light of the foregoing paragraphs, our simpler hypothesis (association of taxis with a decrease in the supply of energy to the locomotor system) seems attractive. Being a more concrete variant of the hypothesis expressed in the previous section, it is equally successful in accounting for the data of Table 4. Moreover, the special role of thiol inhibitors and sulphydryl compounds in taxis fits nicely with the importance of these substances in the contraction of fibrous proteins.

The earliest expression of this hypothesis can be accredited to LINKS (1955) who wrote: "Any substance or condition which can suddenly and reversibly increase the quantity (or consumption) of the energy-supplying substance in the motor apparatus can exercise a chemotactic (phototactic, osmotactic, thermotactic, respectively) 'attraction' on a phototactic organism (chemo, photo, osmo, or thermo) in an experimental construction suitable for this purpose. The energy-supplying substance is probably adenosine triphosphate."

Henceforth we shall refer to this hypothesis as the LINKS Hypothesis, while the less specific hypothesis enunciated in the closing paragraphs of the last section (Discussion; Section A, p. 206) will be termed the CLAYTON Hypothesis.

C. The hypotheses of Links and Clayton; a critique

The LINKS Hypothesis has the virtue of simplicity; the mechanism for taxis is restricted to the system "ATP—flagellar protein", or to something comparable. This simplification has two important consequences:

1. Taxis and motility are linked, in the sense that an agent inducing positive taxis should tend to augment motility, while an agent inducing negative taxis should inhibit motility.

2. The existence of a central agency for the coordination of a tactic response is denied; the mechanism is held to be strictly peripheral. If the term "motor apparatus" in the LINKS Hypothesis is taken to include a central coordinating agency, the simplicity is lost and the hypotheses of LINKS and CLAYTON become effectively identical.

The first of these two consequences seems to be in harmony with our data; agents eliciting negative chemotaxis were usually found to suppress motility, while those causing positive taxes (including light and air) tended to enhance motility. Our experimental situation was such, however, that results supporting the LINKS Hypothesis were automatically selected. An appearance of positive chemotaxis coupled with an inhibition of motility was disregarded, because the positive pattern could have arisen through the motility artefact. It is in just such a case that a contradiction of the LINKS Hypothesis might have been found. A systematic exploration of the relation between taxis and changes in motility,

in which the responses of individual cells are observed, should provide convincing support or contradiction of the LINKS Hypothesis.

Some experiments with ATP and ADP¹ were inconclusive. These substances induce positive chemotaxis; they also suppress phototaxis and aerotaxis, suggesting that in their presence the supply of ATP to the locomotor apparatus is maximal and independent of changes in illumination or oxygen tension. However, the sluggish movement of cells in very dim light, in the absence of air, is not accelerated by ATP or ADP.

The second consequence of the LINKS Hypothesis, that taxis is mediated peripherally, meets with some difficulty: There is evidence that in bipolarly flagellated *Spirilla* the motor activities at both ends of the cell are coordinated, as if by a central agency. The simultaneous Überschnappung of anterior and posterior flagella described by BUDER (1915) suggests central control. METZNER (1920) has found that in some cases the anterior flagella will snap over and the posterior ones will fail to do so. When this happens the bacterium is "stuck", its flagella working against one another. A close examination of these "stuck" cells revealed to METZNER that the flagella at both ends rotated in the same sense: either clockwise or counterclockwise. From time to time, in perfect synchrony, they reversed their sense of rotation. Here we have definite evidence for a central coordination of the activities of flagella.

Another line of evidence is found in the effects of drugs on motility. Substances which have conspicuous effects on the nervous systems of higher animals induce suggestive activities in *R. rubrum* (see Tables 2c and d). For example, adrenaline causes hyperactivity, while curare and lysergic acid induce erratic swimming: frequent reversals and alterations in course and speed.

Finally, the close correspondence between the quantitative aspects of nerve excitation and bacterial phototaxis (CLAYTON 1953c) is suggestive of central coordination.

From these considerations it appears that the attractively simple and explicit LINKS Hypothesis may be an oversimplification. Our observations in the field of taxis are in equally good agreement with the LINKS Hypothesis and with the more conservative and less concrete CLAYTON Hypothesis. At this point it is probably desirable to use both, concurrently, as working hypotheses.

Summary

Resting suspensions of *Rhodospirillum rubrum* exhibit a positive chemotaxis toward sulfhydryl compounds, ATP, ADP, and oxidizable organic substrates such as malate and yeast extract.

¹ *R. rubrum* contains myokinase; see OLIVER and PEEL (1956).

A negative chemotaxis is induced by various oxidizing substances, extremes of pH, and poisons (especially thiol inhibitors).

Positive aerotaxis, displayed in the dark, is inhibited by reducing substances and reversed by strong illumination.

Positive aerotaxis and phototaxis are augmented by organic compounds which serve as metabolic substrates; they are suppressed by ADP and ATP. Positive aerotaxis is suppressed by moderate illumination; phototaxis is suppressed by air.

These effects are discussed in terms of the hypothesis of LINKS that tactic responses are associated with a decrease in the energy available to the locomotor apparatus. A correlation of taxis with the level of oxidation of the electron transport system (cytochromes, etc.) fails. The possibility is discussed that taxis and motility are governed by a central, nerve-like coordinating system. An hypothesis similar to that of LINKS but embracing the possibility of central coordination of taxis is offered.

Acknowledgements. The author again wishes to acknowledge the stimulating effect of many discussions with Professor C. B. VAN NIEL and his associates at the Hopkins Marine Station.

This work was supported financially by the Office of Naval Research.

References

- ASTBURY, W. T., E. BEIGHTON and C. WEIBULL: Symp. Soc. exp. Biol. **9**, 282 (1955).
- BAILEY, K., and S. V. PERRY: Biochim. biophys. Acta **1**, 506 (1947). — BARRON, E. S. G., and T. P. SINGER: J. biol. Chem. **157**, 221 (1945). — BEIJERINCK, M. W.: Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. **14**, 827 (1893). — BRAUN, H.: Arch. Mikrobiol. **24**, 1 (1956). — BUDER, J.: Jb. Bot. **56**, 529 (1915).
- CLAYTON, R. K.: Arch. Mikrobiol. **19**, 107 (1953a); **19**, 125 (1953b); **19**, 141 (1953c); **22**, 195 (1955a); **22**, 204 (1955b); **27**, 311 (1957).
- DE ROBERTIS, E., and C. M. FRANCHI: Exp. Cell Res. **2**, 295 (1951). — DE ROBERTIS, E., and C. A. PELUFFO: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **78**, 584 (1951). — DUYSENS, L. N. M.: Dissertation. Utrecht 1952.
- ENGELMANN, T. W.: Pflüg. Arch. ges. Physiol. **26**, 537 (1881).
- FECHNER, R.: Z. Bot. **7**, 289 (1915). — FLECKENSTEIN, A., J. JANKE, R. E. DAVIES and H. A. KREBS: Nature (Lond.) **174**, 1081 (1954).
- HALLDAL, P.: Nature (Lond.) **179**, 215 (1957). — HAYASHI, K.: J. Physiol. Soc. Japan **17**, 790 (1955). — HOFFMANN-BERLING, H.: Biochim. biophys. Acta **14**, 182 (1954); **16**, 146 (1955).
- KNIEP, H.: Jb. Bot. **43**, 215 (1906).
- LABAW, L. W., and V. M. MOSLEY: Biochim. biophys. Acta **15**, 325 (1954). — LARDY, H. A., R. G. HANSEN and P. H. PHILLIPS: Arch. Biochem. **6**, 41 (1945). — LARSEN, H.: On the Microbiology and Biochemistry of the Photosynthetic Green

Sulfur Bacteria. Trondheim: F. Bruns Bokhandel 1953. — LINKS, J.: Dissertation. Leiden 1955.

MAINX, F.: Arch. Protistenk. **68**, 105 (1929). — MANABU, M.: J. Colloid Sci. Tokyo **10**, Part 2 (1897). — MANTEN, A.: Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. **14**, 65 (1948). — MANTON, I., B. CLARKE, A. D. GREENWOOD and E. A. FLINT: J. exp. Bot. **3**, 204 (1952). — METZNER, P.: Jb. Bot. **59**, 325 (1920). — MOMMAERTS, W. F. H. M.: Nature (Lond.) **174**, 1083 (1954).

OLIVER, I. T., and J. L. PEEL: Biochim. biophys. Acta **20**, 390 (1956).

PRINGSHEIM, E. G., and F. MAINX: Planta (Berl.) **1**, 583 (1926).

SZENT-GYÖRGYI, A. G.: Advanc. Enzymol. **16**, 313 (1955).

THOMAS, J. B., and L. E. NIJENHUIS: Biochim. biophys. Acta **6**, 317 (1950). — TIBBS, J.: Biochim. biophys. Acta **23**, 275 (1957).

WEBER, H. H.: Symp. Soc. exp. Biol. **9**, 271 (1955). — WEIBULL, C.: Nature (Lond.) **167**, 511 (1951).

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos. Vorlagen für Diagramme sind in etwa doppelter Reproduktionsgröße erwünscht.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Tabellen zur Röntgenstrukturanalyse

Von **Konrad Sagel**, Frankfurt am Main. (Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis. Herausgegeben von **H. Mayer-Kaupp**. Band VIII.) VIII, 204 Seiten
Gr.-8° 1958.

Steif geheftet DM 28,—

Das Tabellenwerk entstand aus dem Bedürfnis heraus, dem Röntgenpraktiker bei seiner täglichen Arbeit das ständige zeitraubende Nachschlagen und Suchen in den verschiedensten Büchern oder das Ausrechnen nichttabellierter Funktionen zu ersparen. Die Vielfältigkeit des Gebotenen macht das Buch für alle Probleme der Röntgenstrukturanalyse zu einem wertvollen Hilfsmittel, das eine bis jetzt bestehende Lücke in dem Fachschriftentum schließt. Wer sich als Physiker, Chemiker oder Metallkundler mit Röntgenuntersuchungen beschäftigt, wird in den Tabellen und den Formelsammlungen für alle Aufgaben eine unentbehrliche Unterstützung finden.

Handbuch der Pflanzenphysiologie

Encyclopedia of Plant Physiology

Herausgegeben von W. Ruhland, Unterdeufstetten, in Gemeinschaft mit E. Ashby, Belfast, J. Bonner, Pasadena, M. Geiger-Huber, Basel, W. O. James, Oxford, A. Lang, Los Angeles, D. Müller, Kopenhagen, M. G. Stålfelt, Stockholm. In 18 Bänden. Jeder Band ist einzeln käuflich.

Soeben erschien:

9. Band:

Der Stoffwechsel der schwefel- und phosphorhaltigen Verbindungen

The metabolism of sulfur- and phosphorus-containing compounds

Bearbeitet von H. G. Albaum, B. Axelrod, R. S. Bândurski, Th. Bersin, K. Hasse, A. Kjær, J. A. Lovern, B. J. D. Meeuse, J. R. P. O'Brien, W. Schwartz, P. Schwarze, Te May Ching, M. D. Thomas, W. W. Umbreit, J. M. Wiame. Redigiert von P. Schwarze, Köln-Vogelsang. Mit 30 Abbildungen. X, 306 Seiten Gr.-8°. 1958.

Ganzleinen DM 88,—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuchs

Subskriptionspreis Ganzleinen DM 70,40

Inhaltsübersicht: I. Einführende Bemerkungen. — II. Der Stoffwechsel der S-haltigen Verbindungen. A. Übersicht. B. Der Anteil der S-haltigen Verbindungen am Stoffwechsel. C. Assimilation of sulfur and physiology of essential S-compounds. D. Secondary organic sulfur-compounds of plants (Thiols, sulfides, sulfonium derivatives, sulfoxides, sulfones and *isothiocyanates*). E. Die Schwefelspezialisten unter den Mikroorganismen. F. Le cycle du soufre dans la nature. — III. Der Stoffwechsel der P-haltigen Verbindungen. A. Übersicht. B. Accumulation de l'acide phosphorique (phytine, polyphosphates). C. The phosphatides. D. The phosphoric acid esters in carbohydrate metabolism. E. P-haltige Coenzyme. F. Transphosphorylation (phosphotransferases, mutases and kinases). G. The role of the phosphates in energy transfer (adenosine phosphates). — Jeder Beitrag enthält ein Literaturverzeichnis. — Namenverzeichnis. — Author Index. — Sachverzeichnis (Deutsch-Englisch). — Subject Index (English-German).

SPRINGER-VERLAG/BERLIN·GÖTTINGEN·HEIDELBERG